

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2001年10月18日 (18.10.2001)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 01/77317 A1

(51)国際特許分類7: C12N 15/10, C12Q 1/68

(52) Kentaro) [JP/JP]; 〒324-0036 栃木県大田原市下石上  
1381-3 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/02771

(22)国際出願日: 2001年3月30日 (30.03.2001)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2000-111939 2000年4月7日 (07.04.2000) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 栄研化学  
株式会社 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA)  
[JP/JP]; 〒113-8408 東京都文京区本郷1丁目33番8号  
Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 納富雄宣 (NOTOMI, Tsugunori) [JP/JP]. 長嶺憲太郎 (NAGAMINE,

(74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).

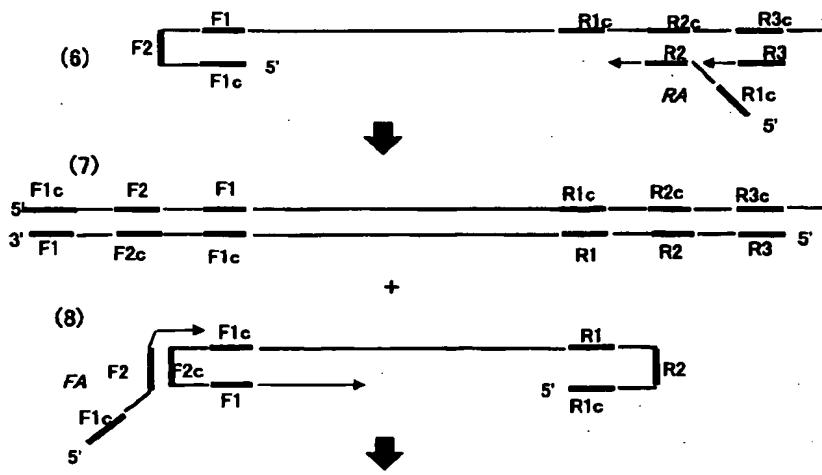
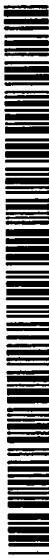
(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KF, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF AMPLIFYING NUCLEIC ACID BY USING DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACID AS TEMPLATE

(54)発明の名称: 2本鎖核酸を錠型とする核酸の増幅方法



WO 01/77317 A1

(57) Abstract: A method of synthesizing a nucleic acid which involves the step of using a double-stranded nucleic acid as a template and incubating under conditions allowing the establishment of a complementary chain synthesis reaction starting with a primer. This method involved the step of using a primer capable of isothermally amplifying the template nucleic acid as the primer and thus enabling base pairing in the domain to be annealed with this primer with the use of an arbitrary primer. The arbitrary primer initiates the complementary chain synthesis reaction, wherein the double-stranded nucleic acid is used as a template, by combining DNA polymerases catalyzing the complementary chain synthesis reaction associated with the destabilization of the double-stranded nucleic acid and chain substitution, thereby providing a domain wherein base pairing can be performed.

[続葉有]



添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

本発明は、2本鎖の核酸を鋳型として用い、プライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件下でインキュベートする工程を含む核酸の合成方法である。プライマーとして等温で鋳型核酸を増幅することができるプライマーを用い、このプライマーがアニールすべき領域を任意のプライマーによって塩基対結合が可能な状態とする工程を含む。任意のプライマーは、2本鎖核酸の不安定化と鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼを組み合わせることにより、2本鎖核酸を鋳型とする相補鎖合成反応を開始し、塩基対結合が可能な領域を与える。

- 1 -

## 明細書

### 2本鎖核酸を錠型とする核酸の増幅方法

#### 技術分野

本発明は、2本鎖の状態にある核酸を錠型として、錠型に対して相補的な塩基配列で構成される核酸を合成する方法に関する。

#### 背景技術

PCR(Polymerase Chain Reaction)法による錠型依存的な核酸の合成方法は、近年の生命科学分野における研究の大きな推進力となった。PCR法は、少量の核酸を錠型として、錠型に対して相補的な塩基配列で構成される核酸の指数関数的な増幅を可能とした。いまやPCR法は、遺伝子のクローニングや検出のための道具として、広く普及している。PCR法では、目的とする塩基配列の両端に対して相補的な塩基配列からなる1組のプライマーが用いられる。一方のプライマーによってもたらされる伸長生成物には、他方のプライマーがアニールするように設計される。こうして、互いの伸長生成物へのアニールと相補鎖合成が繰り返し行われる合成反応が進み、指数関数的な増幅が達成される。

PCR法では、何らかの形で核酸を1本鎖として錠型とし、これにプライマーをアニールさせる工程が必要である。錠型依存型のDNAポリメラーゼが複製開始点としてプライマーを必要とするので、プライマーのアニールのために錠型を1本鎖とする工程はPCR法においては必須と考えられていた。錠型となる2本鎖核酸を1本鎖とする工程は、一般に変性(denature)と呼ばれている。変性は、実際には加熱によって行われるのが一般的である。DNAポリメラーゼを始めとする、核酸の合成に必要な反応成分はいずれも耐熱性であることから、反応に必要な成分を全て加えた上で、反応液を加熱すれば変性と、それに続く相補鎖合成反応を

- 2 -

行うことができる。しかし、このような加熱処理工程を含む従来の方法には以下に述べるような問題点が指摘されている。

まず、PCR 法は、2 本鎖核酸の変性とプライマーのアニールを 1 サイクルごと繰り返さなければならない。そのために、温度制御のための特別な機構が必要である。たとえば、PCR 法に伴う反応生成物の増加をモニタリングするための方法が開発されているが、この方法は汎用の分析装置では実施できず、専用の装置を用意しなければならなかった。反応をモニタリングするための機構に加えて、更に PCR 法を実施するための温度制御機構が必要となるためである。したがって、一定の温度で全ての反応を実施することが可能な核酸の合成方法が実現できれば、反応のモニタリングも汎用の分析装置で手軽に行える可能性がある。このような簡便な手法がもしも実現できるとすれば、装置の問題のみならず、なによりも実験操作を簡略化できる。しかしそのような反応原理は、知られていない。

次に、PCR 法の反応特異性は、プライマーの特異的なアニールに依存する。1 本鎖核酸に対するプライマーのアニールは、融解温度に近い高温では十分な特異性を期待できる。しかし、温度が十分に高くない場合には、非特異的なアニーリングとそれによってもたらされる非特異的な相補鎖合成反応がしばしば観察される。PCR 法においては、複雑な温度変化を伴うため、非特異的な反応を生じやすい温度条件にさらされてしまう可能性が常に伴う。これが PCR 法における、非特異的な反応の原因の一つになっていることが指摘されている。

温度条件による非特異反応の問題点を解決するための方法もいくつか提案された。たとえば、一定温度以下では DNA ポリメラーゼが働けないようようにする方法が実用化されている。このような方法としては、具体的には、温度感受性の DNA ポリメラーゼ阻害物質、DNA ポリメラーゼに対する抗体、あるいは DNA ポリメラーゼの変異体等の利用が報告されている。また、反応液を高温で溶解する隔壁で区画しておき、十分な温度になったときに初めて反応に必要な成分を混合する方法も公知である。いずれにせよ PCR 法では、複雑な温度変化を伴う反応である

- 3 -

ために、非特異反応を防ぐためには特殊な成分の使用が求められる。

検出対象配列を錆型として相補的な配列を持つ DNA を増幅する方法には、SDA 法(Strand Displacement Amplification)[Pro.N.A.S., 89, 392-396; 1992][Nucleic Acid Res., 20, 1691-1696; 1992]と呼ばれる方法も知られている。SDA 法は、ある塩基配列の 3' 側に相補的なプライマーを合成起点として相補鎖合成を行うときに、5' 側に 2 本鎖の領域があるとその 2 本鎖を置換しながら相補鎖の合成を行う特殊な DNA ポリメラーゼを利用する方法である。なお以下本明細書において単に 5' 側、あるいは 3' 側と表現するときには、いずれも錆型となっている方の鎖における方向を意味している。5' 側の 2 本鎖部分が新たに合成された相補鎖によって置換(displacement)されることから SDA 法と呼ばれている。

SDA 法では、プライマーとしてアニールさせた配列に予め制限酵素認識配列を挿入しておくことによって、PCR 法においては必須となっている温度変化工程の省略を実現できる。すなわち、制限酵素によってもたらされるニックが相補鎖合成の起点となる 3'-OH 基を与え、そこから鎖置換合成を行うことによって先に合成された相補鎖が 1 本鎖として遊離して次の相補鎖合成の錆型として再利用される。このように SDA 法は PCR 法で必須となっていた複雑な温度制御を不要とした。

しかし温度制御が不要とはいえ、2 本鎖の核酸を錆型とする場合には、プライマーをアニールさせるための 1 本鎖を生成するために加熱処理が必要となる。また SDA 法では鎖置換型の DNA ポリメラーゼに加え、必ずニックをもたらす制限酵素を組み合わせる必要がある。必要な酵素が増えるということは、コストアップの要因である。また、用いる制限酵素によって 2 本鎖の切断ではなくニックの導入（すなわち一方の鎖だけの切断）を行うために、一方の鎖には酵素消化に耐性を持つように合成の際の基質として  $\alpha$  チオ dNTP のような dNTP 誘導体を利用しなければならない。このため、SDA による増幅産物は天然の核酸とは異なった構造となり、制限酵素による切断や、増幅産物の遺伝子クローニングへの応用といった利用は制限される。またこの点においてもコストアップの要因を伴っていると

- 4 -

いえる。

複雑な温度制御を不要とする核酸の増幅方法として、NASBA(Nucleic Acid Sequence-based Amplification、TMA/Transcription Mediated Amplification 法とも呼ばれる)が公知である。NASBA は、標的 RNA を錆型として T7 プロモーターを付加したプローブで DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を行い、これを更に第 2 のプローブで 2 本鎖とし、生成する 2 本鎖 DNA を錆型として T7 RNA ポリメラーゼによる転写を行わせて多量の RNA を増幅する反応系である(Nature, 350, 91-92, 1991)。NASBA における T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応は等温で進行する。しかし NASBA は RNA を錆型とする反応であり、2 本鎖の核酸に応用することはできない。2 本鎖の核酸を 1 本鎖とすれば同様の反応を構成することもできるが、そのためには PCR と同じような複雑な温度制御が必要である。更に、逆転写酵素、RNaseH、DNA ポリメラーゼ、そして T7 RNA ポリメラーゼといった複数の酵素の組み合わせが必須となることから、SDA と同様にコストの面では不利である。このように公知の核酸増幅反応においては、複雑な温度制御の問題点、あるいは複数の酵素が必要となることといった課題が残されている。

更に、公知の核酸合成方法における温度制御の問題点の解決を目的として、特殊な条件下でプライマーを起点とする相補鎖合成を実施する方法が試みられた(特表平 11-509406; WO97/00330)。この方法は、相補的な塩基配列を持った核酸のハイブリダイゼーションが動的平衡(kinetics)の上に成立することを利用している。すなわちこの先行技術文献においては、完全な変性条件以下の温度においても、プライマーを起点とする相補鎖合成反応が一定の確率で発生する場合があるとされている。ここで完全な変性条件とは、2 本鎖の錆型核酸の大部分が 1 本鎖となる条件を意味する。

この報告においては、2 本鎖の錆型核酸にプライマーと鎖置換型の DNA ポリメラーゼを加えて温度を上げていくと、確かに錆型核酸の変性条件に満たない温度条件下における相補鎖の合成が観察されている。しかし温度変化を行わない条件

- 5 -

下での相補鎖合成反応は、温度変化をともなう一般的な条件で PCR 法を実施した場合に比べると、著しく効率が悪い。実際、本発明者らの追試によれば、確かに反応が起きていることは確認できる。しかしこの方法によって得られる反応生成物の量は、核酸の合成方法としては、実用化できるレベルには満たないものであった。

以上のように、反応の特異性や効率を犠牲にすることなく、温度変化を省略可能な核酸を合成することができる反応は、いまだに報告されていない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、2本鎖核酸を錠型とする核酸の合成方法において、合成効率、操作性、あるいは特異性などを犠牲にすることなく、温度変化を不要とすることである。より具体的には、2本鎖核酸を錠型として、プライマーや DNA ポリメラーゼのような反応成分と一定の温度でインキュベートすることによって反応を行わせることができる、新たな合成方法を提供することが本発明の課題である。更に本発明は、この合成方法を利用して効率よく核酸を増幅する方法の提供を課題とする。

本発明者らは、2本鎖核酸を錠型として、温度変化無しで相補鎖合成を行わせるために、プライマーを起点とする相補鎖合成反応を一定の温度条件下で開始することができないか検討を重ねた。2本鎖核酸とプライマーとの動的平衡に基づく公知の相補鎖の合成方法（特表平 11-509406; WO97/00330）は、確かに温度変化を伴わないという条件を満たすものではあった。しかし先に述べたように、この方法によって実用的な合成効率を達成することは困難であった。そこで本発明者らは、特異性を犠牲にすることなく、動的平衡に基づく相補鎖合成を効率的に進めるために、等温反応に基づく核酸の合成反応との組み合わせを試みた。その結果、公知の方法では達成することができない高度な増幅効率を達成できることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、次の核酸合成方法、並びにこの

方法に基づく核酸の増幅方法に関する。

〔1〕次の工程を含む2本鎖核酸を鑄型とする核酸の合成方法。

- a) 2本鎖からなる鑄型核酸と任意のプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼとともに前記2本鎖核酸とインキュベートすることによって、標的鑄型核酸における等温で鑄型核酸を増幅することができるプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程、
- b) 工程a)において塩基対結合が可能な状態となった領域に、等温で鑄型核酸を増幅することができるプライマーをアニールさせる工程、および
- c) 前記プライマーを合成起点として相補鎖合成を行う工程

〔2〕工程a)を融解温度調整剤の存在下で行う〔1〕に記載の方法。

〔3〕融解温度調整剤が、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルアミンN-オキシドからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である〔2〕に記載の方法。

〔4〕以下の工程を含む相補的な塩基配列で構成される2本鎖の鑄型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が1本鎖上に複数連結された核酸の合成方法。

- a) 2本鎖からなる鑄型核酸と任意のプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼとともに前記2本鎖核酸とインキュベートすることによって、標的鑄型核酸における第2のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程、
- b) 工程a)において塩基対結合が可能となった領域に第2のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に対してアニールし、かつ第2のプライマーの5'末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対し

- 7 -

て相補的な塩基配列を備えるものである、

c) 工程 b) で合成された第 2 のプライマーの伸長産物における第 1 のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程；ここで

第 1 のプライマーはその 3' 末端において前記第 2 のプライマーを起点とする伸長産物における前記特定の領域の 3' 側を規定する領域に対してアニールする、

d) 工程 c) において塩基対結合が可能となった領域に第 1 のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程、および

e) 工程 d) によって合成された第 1 のプライマーの伸長生成物の 3' 末端を自身にアニールさせることによって自身を鋳型とする相補鎖合成を行い、前記特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を得る工程

〔5〕工程 a) における任意のプライマーが第 1 のプライマーである〔4〕に記載の方法。

〔6〕工程 c) が、鋳型における第 2 のプライマーの 3' 側を起点とする第 4 のプライマーの相補鎖合成反応による置換によって行われる〔4〕に記載の方法。

〔7〕工程 e) が、鋳型における第 1 のプライマーがアニールすべき領域の 3' 側を起点とする第 3 のプライマーの相補鎖合成反応による置換によって第 1 のプライマーの伸長生成物を 1 本鎖とする工程を含む〔4〕に記載の方法。

〔8〕第 1 のプライマーが、その 5' 末端に、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである〔4〕に記載の方法。

〔9〕以下の工程を含む、相補的な塩基配列で構成される 2 本鎖の鋳型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を増幅する方法。

- 8 -

- 1) [7] に記載の方法によって生成された第 1 のプライマーの伸長生成物の 3' 末端を自身にアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程、
- 2) 3' 末端の自身へのアニールによって形成されるループ領域に第 2 のプライマー、または第 1 のプライマーをアニールさせてそれを起点とする相補鎖合成を行う工程、
- 3) 工程 2) の相補鎖合成反応によって自身の 3' 末端からの伸長生成物を置換し、その 3' 末端を塩基対結合が可能とする工程、
- 4) 工程 3) によって塩基対結合が可能となった 3' 末端を起点とし自身を錫型とする相補鎖合成反応を行うことによって、工程 2) でループ領域を起点として合成された相補鎖を置換して 1 本鎖の核酸を生成する工程、および
- 5) 工程 2) - 4) を繰り返して目的とする核酸を増幅する工程、

[10] 更に次の工程を含む、[9] に記載の方法。

- 6) 工程 4) によって生成する 1 本鎖の核酸の 3' 末端を自身にアニールさせて相補鎖合成反応を行う工程、
- 7) 3' 末端の自身へのアニールによって形成されるループ領域に第 2 のプライマー、または第 1 のプライマーをアニールさせてそれを起点とする相補鎖合成を行う工程、
- 8) 工程 7) の相補鎖合成反応によって自身の 3' 末端からの伸長生成物を置換し、その 3' 末端を塩基対結合が可能とする工程、
- 9) 工程 8) によって塩基対結合が可能となった 3' 末端を起点とし自身を錫型とする相補鎖合成反応を行うことによって、工程 7) でループ領域を起点として合成された相補鎖を置換して 1 本鎖の核酸を生成する工程、および
- 10) 工程 7) - 9) を繰り返して目的とする核酸を増幅する工程、

[11] [10] に記載の増幅方法を行い、増幅反応生成物が生じたかどうかを観察することにより試料中の標的塩基配列を検出する方法。

- 9 -

〔12〕 核酸の検出剤存在下で〔10〕に記載の方法を行い、検出剤のシグナル変化に基づいて增幅反応生成物が生じたかどうかを観察する〔11〕に記載の方法。

〔13〕 〔11〕に記載の検出方法によって変異を検出する方法であって、増幅対象である塩基配列における変異が、増幅方法を構成する相補鎖合成の起点となる少なくとも1つの3'末端において、相補鎖合成を妨げるものである方法。

〔14〕 次の要素を、第1のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下でインキュベートする工程からなる、相補的な塩基配列で構成される2本鎖の錆型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が1本鎖上に複数連結された核酸を増幅する方法。

- ・増幅すべき特定の領域を含む2本鎖からなる標的錆型核酸
- ・鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼ
- ・第1のプライマー；ここで第1のプライマーはその3'末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に対してアニール、かつ第1のプライマーの5'末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える、
- ・第2のプライマー；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に対してアニール、かつ第2のプライマーの5'末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える、
- ・ヌクレオチド基質

〔15〕 更に付加的に次の要素を存在させる〔14〕に記載の方法。

- ・第3のプライマー；ここで第3のプライマーは、錆型における第1のプライマーがアニールすべき領域の3'側を起点とする相補鎖合成反応の起点となる、および

- 10 -

・第4のプライマー；ここで第4のプライマーは、錆型における第2のプライマーがアニールすべき領域の3'側を起点とする相補鎖合成反応の起点となる、

[16] 融解温度調整剤の存在下でインキュベートする[14]に記載の方  
法。

[17] 融解温度調整剤が、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、  
およびトリメチルアミンN-オキシドからなる群から選択される少なくとも  
1つの化合物である[16]に記載の方法。

[18] 2本鎖からなる錆型核酸、任意のプライマー、および等温で錆型核  
酸を増幅することができるプライマーを、この任意のプライマーを起点とす  
る相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNA  
ポリメラーゼとともにインキュベートする工程を含む、標的錆型核酸にお  
ける等温で錆型核酸を増幅する反応を開始するプライマーがアニールすべき領  
域を塩基対結合が可能な状態とする方法。

本発明では等温で錆型核酸を増幅することができるプライマーを用いる。等温  
で核酸を増幅することができるプライマーとは、そのプライマーがアニールすべ  
き領域において塩基対結合が可能な状態にある核酸を錆型として、温度変化サイ  
クル無しで核酸の増幅を行う方法のためのプライマーを意味する。すなわち本發  
明のプライマーには、温度変化サイクルを必要としない核酸増幅反応用のプライ  
マーを用いる。本発明のプライマーは、等温で核酸増幅反応を開始するプライマ  
ーであれば、特に限定されない。したがって、温度変化サイクルが必要な反応に  
使用できるかどうかに関わらず、等温で行われる核酸増幅反応を開始するプライ  
マーは本発明のプライマーに含まれる。一方、PCR用のプライマーを利用して等  
温での増幅を試みた報告があることを先に述べた。しかしこの試みは、実用的な  
レベルの増幅を達成できないことから、PCR用のプライマーは等温で行われる核  
酸増幅反応を開始するプライマーとは言えない。特に、温度変化工程を必要とせ

- 1 1 -

ず、しかも連続的な相補鎖合成が可能な方法を利用することにより、鑄型核酸の増幅を行うことができる。このような方法に用いられるプライマーは、本発明のプライマーとして望ましい。

好ましい核酸の増幅方法としては、以下に述べるような、3'末端領域を自身にアニールさせて自身を鑄型とする相補鎖合成反応を繰り返す反応原理（LAMP法）を示すことができる。その他、公知の核酸増幅反応である SDA 法を用いることもできる。本発明において、ある領域において塩基対結合が可能であることは、その領域が相補鎖を伴っていない状態にあることを意味する。したがって、2本鎖核酸が1本鎖の状態に変性された状態のみならず、2本鎖の核酸が部分的に1本鎖となっている状態も含まれる。

また本発明において、核酸とは、DNA、またはRNA、あるいはそれらのキメラ分子であることができる。核酸は、天然のものであることもできるし、人工的に合成されたものであることもできる。また部分的に、あるいは全体が完全に人工的な構造からなるヌクレオチド誘導体であっても、それが塩基対結合を形成しうるものであるかぎり本発明の核酸に含まれる。このような分子としては、たとえばホスホチオエート結合によってバックボーンが形成されているポリヌクレオチド誘導体などを示すことができる。本発明における核酸の構成塩基数は、制限されない。核酸は、用語ポリヌクレオチドと同義である。一方本発明におけるオリゴヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドの中でも特に構成塩基数が少ないものを示す用語として用いる。一般にオリゴヌクレオチドは、2～100、より一般的には、2～50程度の塩基数のポリヌクレオチドを指してオリゴヌクレオチドと呼ぶが、これらの数値には限定されない。

本発明において標的塩基配列とは、合成すべき核酸の塩基配列を意味する。すなわち、本発明において合成を目的とする核酸を構成する塩基配列が、標的塩基配列である。また本発明の核酸の合成方法に基づいて、核酸の増幅を行う場合には、増幅すべき核酸を構成する塩基配列が標的塩基配列である。一般に核酸の塩

- 1 2 -

基配列は、5'側から3'側に向けてセンス鎖の塩基配列を記載する。本発明における標的塩基配列とは、センス鎖の塩基配列に加えて、その相補鎖、すなわちアンチセンス鎖の塩基配列も含む。すなわち、用語「標的塩基配列」とは、合成すべき塩基配列、およびその相補鎖の少なくともいずれかを意味する用語として用いる。

本発明の核酸の合成方法は、2本鎖核酸を鋳型として用いる。本発明において2本鎖核酸とは、少なくとも相補鎖合成の合成起点となるプライマーに相補的な塩基配列からなる領域において、既にその相補鎖がハイブリダイズしている状態にある核酸を言う。したがって、標的塩基配列が部分的に2本鎖の状態にない場合でも、本発明における2本鎖核酸に含まれる。また本発明の2本鎖核酸は、ダイマーのみならず、前記条件を満たす限り2以上の1本鎖核酸が相互にハイブリダイズした状態であることもできる。更に、分子内に相補的な塩基配列を含む1本鎖のポリヌクレオチドによって構成されるヘアピンループであることもできる。2本鎖核酸としては、たとえばcDNAやゲノムDNA、DNA-RNAハイブリッド等を示すことができる。あるいはこれらのDNAを各種のベクターに挿入したものを本発明の2本鎖核酸として用いることもできる。本発明の2本鎖核酸は、精製されていても良いし、未精製であることもできる。また、細胞内に存在する状態(*in situ*)で、本発明の方法を適用することもできる。細胞内の2本鎖核酸を鋳型とすることによって、ゲノムの*in situ*解析が可能となる。

本発明においてcDNAを鋳型として用いる場合、cDNAを合成する工程と、本発明に基づく核酸の合成方法とを、同一の条件下で実施することができる。RNAを鋳型としてcDNAの第1鎖を合成すると、DNA-RNAハイブリッドによる2本鎖核酸が完成する。この2本鎖核酸を本発明における鋳型として、核酸の合成方法を実施することができる。本発明の核酸の合成方法に用いるDNAポリメラーゼが、逆転写酵素活性を備えるものであれば、单一の酵素を用い、同一の条件下で核酸の合成を行うことができる。たとえばBca DNAポリメラーゼは、鎖置換活性を有

- 1 3 -

し、逆転写酵素活性を併せ持つDNAポリメラーゼである。なお、第2鎖を合成したうえで完全な2本鎖cDNAとした後に、本発明による核酸の合成方法を適用することは言うまでも無い。

本発明の核酸の合成には、鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼが利用される。本発明において鎖置換を伴う相補鎖合成反応とは、次のような反応を言う。すなわち、プライマーを合成起点とする相補鎖合成反応の錆型に他のポリヌクレオチドが既にハイブリダイズして2本鎖構造となっているときに、そのポリヌクレオチドを錆型から分離しながら相補鎖合成が進行する反応を、鎖置換を伴う相補鎖合成反応と言う。このとき、分離されるポリヌクレオチドは、通常、そのホスホジエステル結合が維持される。したがって、相補鎖合成が行われた長さに相当する長さを有し、塩基対結合が可能な状態のポリヌクレオチドが生成されることになる。

鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼとしては、SDAなどに用いられたDNAポリメラーゼと同様のものが用いられる。すなわち、ある塩基配列の3'側に相補的なプライマーを合成起点として相補鎖合成を行うときに、5'側に2本鎖の領域があるとその2本鎖を置換しながら相補鎖の合成を行う特殊なポリメラーゼが公知である。本発明においては、更に相補鎖合成に必要な基質が添加される。

本発明においては、2本鎖核酸に任意のプライマーを加え、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件のもとでインキュベートされる。本発明の任意のプライマーとは、等温で進行する核酸の增幅反応用のプライマーがアーナールすべき領域を塩基対結合可能な状態するために用いられる。したがって、任意のプライマーは、錆型となる2本鎖核酸の、増幅反応用プライマーがアーナールすべき核酸鎖に対して、その相補鎖を錆型として相補鎖合成を開始することができるものである必要がある。更に、本発明における任意のプライマーを合成起点とする相補鎖合成は、増幅反応用のプライマーがアーナールすべき領域に向

- 1 4 -

かって進行するような位置関係にあるべきである。言いかえれば、増幅反応用プライマーを起点とする相補鎖合成反応において錆型として機能する領域の、任意の領域において合成起点を与えるものであることができる。任意のプライマーは、この条件を満たす限り、任意の領域に相補的な塩基配列からなることができる。たとえば、増幅反応用プライマーのセットの一方を、任意のプライマーとして用いることもできる。このような態様は反応に必要な成分を少なくすることから、本発明における望ましい態様の一つである。

任意のプライマーを起点とする相補鎖合成で 2 本鎖核酸の一方の鎖を置換し、増幅反応用のプライマーによる塩基対結合が可能な状態とすることができます。この条件を採用したことによって、本発明の最大の特徴である温度変化の不要な合成反応が実現できた。任意のプライマーによる 2 本鎖の状態にある核酸を錆型とする相補鎖合成反応が達成できる条件とは、実際には次の複数の工程を同じ条件下で進めることができる条件ということができる。

- i) 2 本鎖の状態にある錆型核酸に対して任意のプライマーが合成起点を与える
- ii) 前記合成起点を利用して相補鎖合成反応が進む

プライマーは少なくともそれがアニールすべき領域が 1 本鎖でなければ合成起点を与えることはできないと考えられていた。そのため従来は、2 本鎖の核酸を錆型とする場合には、プライマーのアニールに先立って必ず変性によって 1 本鎖とする工程が実施されてきた。しかし必ずしも完全な 1 本鎖としなくとも、何らかの手段によって 2 本鎖が不安定化される条件のもとで、プライマーとインキュベートすることにより、合成起点を与えることができる。2 本鎖が不安定化される条件としては、たとえば融解温度（以下、 $T_m$  と省略する）近くにまで加温する方法を示すことができる。あるいは、更に  $T_m$  調整剤を存在させることも有効である。

一連の反応は、酵素反応に好適な pH を与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度 ( $T$ )

- 15 -

m)の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl 等の中性から弱アルカリ性に緩衝作用を持つものが用いられる。pH は使用する DNA ポリメラーゼに応じて調整する。塩類としては KCl、NaCl、あるいは  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等が、酵素の活性維持と核酸の融解温度( $T_m$ )調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。

更に融解温度( $T_m$ )の調整剤には、ペタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド(以下、DMSO と省略する)、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、あるいはトリメチルアミン N-オキシド(TMANO)が一般に利用される。融解温度( $T_m$ )の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の下で調整することができる。更にペタイン( $\text{N},\text{N},\text{N},\text{-trimethylglycine}$ )やテトラアルキルアンモニウム塩は、その isostabilize 作用によって鎖置換効率の向上にも有効である。ペタインは、反応液中 0.2~3.0 M、好ましくは 0.5~1.5 M 程度の添加により、本発明の核酸增幅反応の促進作用を期待できる。これらの融解温度の調整剤は、融解温度を下げる方向に作用するので、塩濃度や反応温度等のその他の反応条件を考慮して、適切なストリングエンシーと反応性を与える条件を経験的に設定する。

$T_m$  調整剤を利用することにより、酵素反応に好適な温度条件を容易に設定することができる。 $T_m$  はプライマーと標的塩基配列の関係によって変動する。したがって、酵素活性を維持できる条件と、本発明の条件を満たすインキュベーションの条件とが一致するように、 $T_m$  調整剤の使用量を調整することが望ましい。本発明の開示に基づいて、プライマーの塩基配列に応じて適切な  $T_m$  調整剤の使用量を設定することは、当業者にとって自明である。たとえば、アニールする塩基配列の長さとその GC 含量、塩濃度、および  $T_m$  調整剤の濃度に基づいて、 $T_m$  を算出することができる。

このような条件下における 2 本鎖の核酸に対するプライマーのアニールは、おそらく不安定であると推測される。しかし鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒す

- 1 6 -

るポリメラーゼとともにインキュベートすることにより、不安定ながらプライマーを合成起点として相補鎖が合成される。相補鎖合成の進行にともなって、合成された相補鎖と鑄型核酸とのハイブリダイズは次第に安定化されることになる。

以下に示すような DNA ポリメラーゼは、2本鎖からなる鑄型核酸に対してプライマーを合成起点として、相補鎖の合成を触媒することができる。

本発明による核酸の合成方法を支えているのは、鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼである。この種の DNA ポリメラーゼには、以下のようないわゆる変異体が知られている。また、これらの酵素の各種変異体についても、それが配列依存型の相補鎖合成活性と鎖置換活性を有する限り、本発明に利用することができる。ここで言う変異体とは、酵素の必要とする触媒活性をもたらす構造のみを取り出したもの、あるいはアミノ酸の変異等によって触媒活性、安定性、あるいは耐熱性を改変したもの等を示すことができる。

Bst DNA ポリメラーゼ

Bca(exo-)DNA ポリメラーゼ

DNA ポリメラーゼ I のクレノウ・フラグメント

Vent DNA ポリメラーゼ

Vent(Exo-)DNA ポリメラーゼ (Vent DNA ポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

DeepVent DNA ポリメラーゼ

DeepVent(Exo-)DNA ポリメラーゼ (DeepVent DNA ポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

Φ29 ファージ DNA ポリメラーゼ

MS-2 ファージ DNA ポリメラーゼ

Z-Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造)

KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)

これらの酵素の中でも Bst DNA ポリメラーゼや Bca(exo-)DNA ポリメラーゼは、

- 17 -

ある程度の耐熱性を持ち、触媒活性も高いことから特に望ましい酵素である。本発明は2本鎖の状態にある核酸に対して、プライマーを合成起点とする工程と、相補鎖合成反応とを同一条件下で行う。このような反応は、しばしばある程度の加温を必要とすることから、酵素が耐熱性であることは望ましい条件の一つである。耐熱性の酵素を用いることにより、幅広い反応条件に対応することができる。

たとえば Vent(Exo-)DNA ポリメラーゼは、鎖置換活性と共に高度な耐熱性を備えた酵素である。ところで DNA ポリメラーゼによる鎖置換を伴う相補鎖合成反応は、1本鎖結合タンパク質(single strand binding protein)の添加によって促進されることが知られている(Paul M.Lizardi et al, Nature Genetics 19, 225-232, July, 1998)。この作用を本発明に応用し、1本鎖結合タンパク質を添加することによって相補鎖合成の促進効果を期待することができる。Vent(Exo-)DNA ポリメラーゼに対しては、1本鎖結合タンパク質として T4 gene 32 が有効である。

なお 3'-5' エクソヌクレアーゼ活性を持たない DNA ポリメラーゼには、相補鎖合成が鋲型の 5' 末端に達した部分で停止せず、1 塩基突出させた状態まで合成を進める現象が知られている。本発明では、相補鎖合成が末端に至ったときの 3' 末端の配列が次の相補鎖合成の開始につながるため、このような現象は望ましくない。しかし、DNA ポリメラーゼによる 3' 末端への塩基の付加は、高い確率で A となる。したがって、dATP が誤って 1 塩基付加しても問題とならないように、3' 末端からの合成が A で開始するように配列を選択すれば良い。また、相補鎖合成時に 3' 末端がたとえ突出してしまっても、これを消化して blunt end とする 3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性を利用することもできる。たとえば、天然型の Vent DNA ポリメラーゼはこの活性を持つことから、Vent(Exo-)DNA ポリメラーゼと混合して利用することにより、この問題を回避することができる。

これらの DNA ポリメラーゼに対して、PCR などで一般に用いられている Taq ポリメラーゼ等の DNA ポリメラーゼは、通常の条件では鎖置換作用は実質的に見ら

- 18 -

れない。しかし、この種のDNAポリメラーゼであっても、鎖置換が可能な条件を与えることができる場合には、本発明に利用することができる。

2本鎖核酸が不安定化する条件下で、プライマーをインキュベートすることによって相補鎖が合成される現象は、既に報告されている（特表平11-509406; WO97/00330）。しかし報告された条件では、実際にはごくわずかな量の合成生成物しか期待できない。2本鎖核酸の不安定化を利用してプライマーを合成起点として相補鎖合成を行うことは、原理的には可能であるが、1本鎖の核酸を鋳型とする反応ほど効率的な反応を期待できないのである。PCR法のような温度変化を必要とする相補鎖合成反応との組み合わせにおいては、2本鎖の不安定化を利用した相補鎖合成反応の効率が全ての相補鎖合成反応に影響するので、実用的な反応効率を達成することは困難である。このことが公知の方法における不十分な増幅効率の原因となっていた。

一方本発明は、2本鎖核酸の不安定化に基づく相補鎖合成反応を、もともと等温で進行する核酸増幅反応のためのプライマーがアニールすべき領域を供給することに応用したことによって、2本鎖の不安定化に基づく相補鎖合成の効率の低さを補うことができるという新規な知見に基づいている。本発明においては、等温で進行する核酸増幅反応を利用しているので、プライマーがアニールする領域において塩基対結合が可能な状態を作り出すことさえできれば、以降の反応は2本鎖の不安定化を必要としない相補鎖合成反応が進行する。そのため、2本鎖の不安定化に基づく相補鎖合成反応の効率の低さの影響を最小限度にすることが可能となる。両者の組み合わせによって、初めて実用的な水準の合成効率が達成された。言い換えれば、2本鎖の不安定化に基づく相補鎖の合成反応は、等温で進行する核酸増幅反応用のプライマーがアニールすべき領域を供給するための反応として有用である。逆に、温度サイクルを必要とする核酸増幅反応に応用することは困難である。

本発明における等温で核酸の増幅が可能な方法としては、たとえば3'末端領

- 19 -

域を自身にアニールさせて自身を鑄型とする相補鎖合成反応を用いるのが望ましい。つまり温度変化を必要としないという本発明の最大の特徴は、特に次のようなプライマーを用いる場合に有用である。このような特殊な構造のプライマーに基づく核酸の増幅方法は、本発明者によって考え出された方法である。以下、この方法を LAMP 法(Loop-mediated isothermal amplification)と記載する。LAMP 法は、鑄型ポリヌクレオチドに自身の 3' 末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせることによって等温での相補鎖合成反応を可能とした。しかし 2 本鎖の鑄型に対して適用するときに、変性工程を不要とすることは本発明によってもたらされた新規な知見である。

すなわち本発明は、本発明に基づく核酸の合成方法であって、等温で核酸を増幅することができるプライマーが、少なくとも以下の 2 つの領域 X 2 および X 1 c とで構成され、X 2 の 5' 側に X 1 c が連結されたオリゴヌクレオチドである核酸の合成方法に関する。

ここで X 2 は、特定の塩基配列を持つ核酸の任意の領域 X 2 c に相補的な塩基配列を持つ領域と定義される。

また X 1 c は、特定の塩基配列を持つ核酸における領域 X 2 c の 5' 側に位置する任意の領域と実質的に同じ塩基配列を持つ領域と定義される。

このプライマーを以下の説明において第 1 のプライマー、および第 2 のプライマーとして利用する。第 1 のプライマーと第 2 のプライマーは、互いに一方を起点として合成された伸長生成物に対して、他方のプライマーがアニールし相補鎖合成反応の起点とすることができます。このような核酸の合成方法によってもたらされるプライマーを合成起点とする合成産物は、後に述べるような核酸の増幅方法を可能とする。すなわち本発明は、次の工程を含む相補的な塩基配列で構成される 2 本鎖の鑄型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸の合成方法に関する。本発明において、ある塩基配列 1 に対して相補的

- 2 0 -

な塩基配列 2 が同一の鎖上に少なくとも 1 つ存在するとき、1 本鎖上に複数の相補的な塩基配列を含むと言う。

- a) 2 本鎖からなる鑄型核酸と任意のプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼとともに前記 2 本鎖核酸とインキュベートすることによって、標的鑄型核酸における等温で鑄型核酸を増幅することができるプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程、
- b) 工程 a) において塩基対結合が可能となった領域に第 2 のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第 2 のプライマーはその 3' 末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の 3' 側を規定する領域に対してアニールし、かつ第 2 のプライマーの 5' 末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、
- c) 工程 b) で合成された第 2 のプライマーの伸長産物における第 1 のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程
- d) 工程 c) において塩基対結合が可能となった領域に第 1 のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程；ここで第 1 のプライマーはその 3' 末端において前記第 2 のプライマーを起点とする伸長産物における前記特定の領域の 3' 側を規定する領域に対してアニールする、
- e) 工程 d) によって合成された第 1 のプライマーの伸長生成物の 3' 末端を自身にアニールさせることによって、自身を鑄型とする相補鎖合成を行い、前記特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を得る工程

上記反応のうち、工程 a) のみが 2 本鎖核酸の不安定化によって達成される反応である。この工程によってアニールすべき領域を得た増幅反応用のプライマー（すなわち第 2 のプライマー）による伸長生成物は、以降の反応の鑄型として利

- 2 1 -

用される。なお、増幅反応用のプライマーに限らず、本発明における相補鎖合成には、鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼが用いられることから、プライマーのアニールさえ達成されれば、相補鎖合成反応の進行方向に位置する2本鎖構造は、反応を妨げない。

更に、本発明において、この工程以降で進行する反応は、もともと等温で進行する反応であることから、もはや効率の悪い2本鎖核酸の不安定化による相補鎖合成には依存しない。すなわち、工程a)におけるプライマーを合成起点とする相補鎖合成によって、以降の等温で進行する核酸の増幅反応が開始されるのである。

ところで、等温で進行する核酸の増幅反応が開始した後も、反応系に存在する標的塩基配列に対するプライマーは、常に2本鎖核酸の不安定化に基づく相補鎖合成を開始する可能性がある。このような反応が起きる可能性は否定できないし、もしも反応が生じれば全体の反応効率の向上に貢献することは言うまでも無い。しかし、いったん開始した増幅反応の過程で付随的に生じる、2本鎖核酸の不安定化に基づく相補鎖合成反応は、本発明による核酸の増幅反応の必須の条件ではない。

上記反応の工程c)を行うには、アウタープライマーの利用が有利である。本発明において、アウタープライマーとは、標的塩基配列に対してアニールしているプライマー（アウタープライマーに対して、これをインナープライマーと呼ぶ）に向かって進行する相補鎖合成反応の起点を与えるプライマーである。したがってアウタープライマーがアニールするのは、インナープライマーから見れば5'側（鋸型における3'側）の領域となる。アウタープライマーは、プライマーとして機能する塩基配列を少なくともその3'側に備えるオリゴヌクレオチドを用いることができる。この例においては、第1のプライマーと第2のプライマーがインナープライマーに相当する。

一方インナープライマーは、鋸型となる2本鎖核酸の、合成すべき領域の塩基

- 2 2 -

配列に相補的な塩基配列を 3' 末端に含んでなる。インナープライマーは通常 2 つのプライマーのセットとして用いられる。しかもしも合成すべき領域が同じ 塩基配列を繰り返し含む場合には、2 つのプライマーは同じ塩基配列からなるものであることもできる。一方のインナープライマーは、他方のインナープライマーからの伸長生成物に対してアニールすることができるよう設計される。增幅すべき領域の少なくとも両端の塩基配列が明らかである場合に、プライマーとして用いる塩基配列を設定する方法は公知である。

インナープライマーは、3' 側が標的塩基配列にアニールし得るものであれば、その 5' 側に任意の配列を付加しておくことができる。インナープライマーの 5' 側に任意の塩基配列を付加することによって、本発明の核酸の合成方法に基づいて多くのバリエーションを実現できる。その具体的な例を後に述べる。

本発明におけるインナープライマーは、ネストさせることもできる。すなわち、第 1 の標的塩基配列に対してアニールすることができる第 1 のインナープライマーのセットに対して、更に第 2 の標的塩基配列に対してアニールすることができる第 2 のインナープライマーのセットを組み合わせることができる。この組み合せにおいて、第 2 の標的塩基配列とは、第 1 の標的塩基配列をその内部に含んでなる塩基配列である。インナープライマーをネストさせる場合には、アウタープライマーは第 2 のインナープライマーに対して、その 5' 側（鋳型における 3' 側）にアニールできるように設定する。

インナープライマーが通常 2 つのプライマーの組み合わせで構成されるのに対して、アウタープライマーは、任意の数であることができる。本発明において、一般的なアウタープライマーは、各インナープライマーがアニールしている領域に向かって進行する相補鎖合成反応の起点を与える 2 つのアウタープライマーからなる。しかし、いずれかのインナープライマーに対してのみ、アウタープライマーを配置する場合でも、本発明の方法を実施することができる。あるいは、

- 2 3 -

1つのインナープライマーに対して、複数のアウタープライマーを組み合わせることもできる。いずれにせよ、インナープライマーがアニールしている領域に向かって進行する相補鎖合成を伴う場合に、インナープライマーを合成起点とする相補鎖合成反応の生成物を効率良く生じさせることが可能となる。

本発明におけるアウタープライマーからの相補鎖合成は、インナープライマーを合成起点とする相補鎖合成よりも後に開始されるように設計する。そのための最も単純な方法はインナープライマーの濃度をアウタープライマーの濃度よりも高くすることである。具体的には、通常2～50倍、望ましくは4～10倍の濃度差でプライマーを用いることにより、インナープライマーからの相補鎖合成を優先的に行わせることができる。またアウタープライマーの融解温度( $T_m$ )をインナープライマーの $T_m$ より低くなるように設定することによって相補鎖合成反応のタイミングをコントロールすることもできる。融解温度( $T_m$ )は、他の条件が一定であればアニールする相補鎖の長さと塩基対結合を構成する塩基の組み合わせによって理論的に算出することができる。したがって当業者は、本明細書の開示に基づいて望ましい条件を容易に導くことができる。

更にアウタープライマーのアニールのタイミングを調整するために、コンティギュアス・スタッキング(contiguous stacking)と呼ばれる現象を応用することもできる。コンティギュアス・スタッキングとは、単独ではアニールすることができないオリゴヌクレオチドが2本鎖部分に隣接することによってアニールが可能となる現象である(Chiara Borghesi-Nicoletti et.al. Bio Techniques 12, 47 4-477(1992))。つまり、アウタープライマーをインナープライマーに隣接させ、しかもアウタープライマー単独ではインキュベーションの条件下ではアニールできないように設計しておくのである。こうすれば、インナープライマーがアニールしたときに初めてアウタープライマーのアニールが可能となるので、必然的にインナープライマーのアニールが優先されることになる。この原理に基づいて、一連の反応にプライマーとして必要なオリゴヌクレオチドの塩基配列を設定した

- 2 4 -

例が実施例に記載されている。

以下の説明では仮に一方のインナープライマーにおけるX 2 およびX 1 c をF 2 およびF 1 c、他方のインナープライマーにおけるX 2 およびX 1 c をR 2 およびR 1 c とする。そして説明に用いるインナープライマーを、仮にF A およびR A と名づける。F A とR A は、そのいずれかが本発明の第1のプライマーであり、他方が第2のプライマーとして機能する。F A とR A を構成する領域は、以下のとおりである。

X 2	X 1 c	
F A	F 2	F 1 c
R A	R 2	R 1 c

本発明の核酸の増幅方法においては、前記工程A) ~ C) を経て3'末端に同一鎖上的一部F 1 c にアニールすることができる領域F 1 を備え、この領域F 1 が同一鎖上のF 1 c にアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域F 2 c を含むループを形成することができる核酸を生成することが重要である。次の構造を持ったインナープライマーを利用した本発明に基づく核酸の合成反応によってその構造を与えることができる。この反応の詳細については、先に述べたとおりである。

すなわち本発明の核酸の増幅反応に用いるインナープライマーとは、少なくとも前記2つの領域X 2 およびX 1 c とで構成され、X 2 の5'側にX 1 c が連結されたオリゴヌクレオチドからなる。

ここで、本発明におけるインナープライマーの構造を決定する特定の塩基配列を持つ核酸とは、本発明におけるインナープライマーをプライマーとして利用するときに、その錫型となる核酸を意味する。本発明の合成方法に基づいて核酸の増幅を行う場合には、特定の塩基配列を持つ核酸とは、増幅対象、あるいは増幅対象から誘導された2本鎖の核酸である。特定の塩基配列を持つ2本鎖の核酸は、少なくともその一部の塩基配列が明らかとなっている、あるいは推測が可能な状

- 2 5 -

態にある核酸を意味する。塩基配列を明らかにすべき部分とは、前記領域X 2 c およびその5'側に位置する領域X 1 cである。この2つの領域は、連続する場合、そして離れて存在する場合とを想定することができる。両者の相対的な位置関係により、生成物である核酸が自己アニールしたときに形成されるループ部分の状態が決定される。また、生成物である核酸が分子間のアニールではなく自己アニールを優先的に行うためには、両者の距離が不必要に離れないほうが望ましい。したがって、両者の位置関係は、通常0-500塩基分の距離を介して連続するようになるのが望ましい。ただし、後に述べる自己アニールによるループの形成において、両者があまりにも接近している場合には望ましい状態のループの形成を行うには不利となるケースも予想される。ループにおいては、新たなオリゴヌクレオチドのアニールと、それを合成起点とする鎖置換を伴う相補鎖合成反応がスムーズに開始できる構造が求められる。したがってより望ましくは、領域X 2 c およびその5'側に位置する領域X 1 cとの距離が、0~100塩基、さらに望ましくは10~70塩基となるように設計する。なおこの数値はX 1 cとX 2 を含まない長さを示している。ループ部分を構成する塩基数は、更にX 2 に相当する領域を加えた長さとなる。

なお本発明に用いるプライマーを構成する塩基配列の特徴付けのために用いられる同一、あるいは相補的という用語は、いずれも完全に同一、あるいは完全に相補的であることを意味しない。すなわち、ある配列と同一とは、ある配列に対してアニールすることができる塩基配列に対して相補的な配列をも含むことができる。他方、相補的とは、ストリンジエントな条件下でアニールすることができ、相補鎖合成の起点を提供することができる配列を意味する。本発明において、同一とは、塩基配列の相同性が、例えば90%以上、通常95%以上、より好ましくは98%以上であることを言う。また相補的とは、相補配列と同一の塩基配列を意味する。すなわち、相補配列に対して、塩基配列の相同性が、例えば90%以上、通常95%以上、より好ましくは98%以上であるときに相補的と言うことである。

- 2 6 -

とができる。なお、相補的な塩基配列は、それが相補鎖合成の起点として機能するときに、その 3' 末端の少なくとも 1 塩基が、相補配列完全に一致することが望ましい。

上記特定の塩基配列を持つ核酸に対して本発明におけるインナープライマーを構成する領域 X 2 および X 1 c は、通常は重複することなく連続して配置される。あるいはもしも両者の塩基配列に共通の部分があるのであれば、部分的に両者を重ねて配置することもできる。X 2 はプライマーとして機能する必要があることから、常に 3' 末端となるようにしなければならない。一方 X 1 c は、後に述べるように、これを鋳型として合成された相補鎖の 3' 末端にプライマーとしての機能を与える必要があることから、5' 末端に配置する。このオリゴヌクレオチドを合成起点として得られる相補鎖は、次のステップにおいては逆向きからの相補鎖合成の鋳型となり、最終的には本発明によるインナープライマー部分も鋳型として相補鎖に写し取られる。写し取られることによって生じる 3' 末端は塩基配列 X 1 を備えており、同一鎖上の X 1 c にアニールするととともに、ループを形成する。

本発明におけるインナープライマーとは、標的塩基配列と相補的な塩基対結合を形成できること、そしてその 3' 末端において相補鎖合成の起点となる-OH 基を与えること、の 2 つの条件を満たすものを意味する。したがって、そのバックボーンは必ずしもホスホジエステル結合によるものに限定されない。たとえばホスホチオエート体からなるものであることもできる。また、塩基は、相補的な塩基対結合を可能とするものであれば良い。天然の状態では、一般には ACTG および U の 5 種類となるが、たとえばプロモデオキシウリジン(bromodeoxyuridine)といった類似体であることもできる。本発明に用いるオリゴヌクレオチドは、合成の起点となるのみならず、相補鎖合成の鋳型としても機能するものであることが望ましい。

本発明におけるインナープライマーは、以下に述べる各種の核酸合成反応にお

- 27 -

いて、与えられた環境の下で必要な特異性を維持しながら相補鎖との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を持つ。具体的には、5-200 塩基、より望ましくは 10-50 塩基とする。配列依存的な核酸合成反応を触媒する公知のポリメラーゼが認識するプライマーの鎖長が、最低 5 塩基前後であることから、アニールする部分の鎖長はそれ以上である必要がある。加えて、塩基配列としての特異性を期待するためには、確率的に 10 塩基以上の長さを利用するのが望ましい。一方、あまりにも長い塩基配列は化学合成によって調製することが困難となることから、前記のような鎖長が望ましい範囲として例示される。なお、ここで例示した鎖長はあくまでも相補鎖とアニールする部分の鎖長である。本発明によるインナープライマーは、少なくとも 2 つの領域 X<sub>2</sub> および X<sub>1c</sub> からなっている。したがって、ここに例示する鎖長は、インナープライマーを構成する各領域の鎖長と理解すべきである。

更に、本発明におけるインナープライマーは、公知の標識物質によって標識することができる。標識物質としては、ジゴキシンやビオチンのような結合性リガンド、酵素、蛍光物質や発光物質、あるいは放射性同位元素などを示すことができる。あるいは、インナープライマーを構成する塩基を蛍光性のアノログに置換する技術(WO95/05391, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6644-6648, 1994)も公知である。

この他本発明におけるインナープライマーは、それ自身を固相に結合させておくこともできる。あるいは、インナープライマーの任意の部分をビオチンのような結合性のリガンドで標識しておき、これを固相化アビシンのような結合パートナーによって間接的に固相化することもできる。固相化したインナープライマーを合成開始点とする場合には、核酸の合成反応生成物が固相に捕捉されることから、分離が容易となる。分離された生成物に対して、核酸特異的な指示薬や、あるいは更に標識プローブをハイブリダイズさせることによって、検出を行うこともできる。あるいは、任意の制限酵素で消化することによって、目的とする核酸

- 2 8 -

の断片を回収することもできる。

本発明において用いられる鋳型という用語は、相補鎖合成の鋳型となる側の核酸を意味する。鋳型に相補的な塩基配列を持つ相補鎖は、鋳型に対応する鎖としての意味を持つが、両者の関係はあくまでも相対的なものに過ぎない。すなわち、相補鎖として合成された鎖は、再び鋳型として機能することができる。つまり、相補鎖は鋳型になることができる。

本発明におけるインナープライマーは前記2つの領域のみならず、更に付加的な領域を含むことができる。すなわちX<sub>2</sub>とX<sub>1c</sub>とがそれぞれ3'末端と5'末端に配置される一方、両者の間に任意の配列を介在させることができるとある。それは、たとえば制限酵素認識配列、RNAポリメラーゼが認識するプロモーター、あるいはリボザイムをコードするDNA等であることができる。制限酵素認識配列とすることにより、本発明の合成産物である1本鎖上に複数の相補的な塩基配列が連結された核酸と同じ長さを持った2本鎖核酸に切りそろえることができるようになる。RNAポリメラーゼが認識するプロモーター配列を配置すれば、本発明の合成生成物を鋳型として更にRNAへの転写が行われる。このときに、更にリボザイムをコードするDNAを配置すれば、転写生成物を自身で切断する系が実現する。なお、これらの付随的な塩基配列はいずれも2本鎖となった場合に機能するものである。したがって、本発明による1本鎖の核酸がループを形成しているときには、これらの配列は機能しない。核酸の伸長が進み、ループを含まない状態で相補的な塩基配列を持つ鎖とアニールした状態になったときにはじめて機能する。

本発明におけるインナープライマーに対して、合成された領域の転写を可能とする方向でプロモーターを組み合わせた場合、同じ塩基配列を繰り返す本発明に基づく反応生成物は、高度に効率的な転写系を実現する。これを適当な発現系と組み合わせることによって、タンパク質への翻訳も可能である。すなわち、細菌や動物細胞内で、あるいはin vitroでの転写とタンパク質への翻訳に利用する

- 2 9 -

ことができる。

本発明に用いる各種のプライマーは、化学的に合成することができる。あるいは天然の核酸を制限酵素などによって切断し、上記のような塩基配列で構成されるように改変する、あるいは連結することも可能である。

前記インナープライマーF AおよびR Aを利用し、鎖置換活性を持ったDNAポリメラーゼと組み合わせて2本鎖の核酸を増幅する反応について、基本的な原理を図1-図4に基づいて以下に説明する。この例においては、インナープライマーであるF AおよびR Aが増幅用プライマーのセットを構成しており、更にR Aは本発明における任意のプライマーとして作用する。

上記任意のプライマー（図1-(1)におけるR A）は、まず鑄型となる2本鎖核酸におけるX 2 c (R 2 cに相当)にアニールし相補鎖合成の起点となる。このとき2本鎖核酸は不安定化する条件下に置かれており、2本鎖の核酸に対してプライマーが直接相補鎖合成反応の起点として機能する。図1-(2)においてはR Aを起点として合成された相補鎖が、鑄型となった2本鎖核酸の一方の鎖を置換し、増幅反応用プライマーであるF Aがアニールする領域F 2 cが塩基対結合が可能な状態となっている（図1-(2)）。

得られた塩基対結合が可能となった領域F 2 cに対してF Aをアニールさせて相補鎖合成を行う。この例においては、更にF Aの5'側（鑄型における3'側）から相補鎖合成を開始するアウタープライマーF 3がアニールする（図2-(4)）。アウタープライマーは、各インナープライマーの5'側（鑄型における3'側）からの相補鎖合成を開始するように設計されており、しかもインナープライマーよりもT<sub>m</sub>が高い上に低濃度で用いるので、常にインナープライマーよりも低い確率で相補鎖合成を開始する。アウタープライマーF 3を起点とする相補鎖合成の結果、インナープライマーF Aを起点として伸長した合成生成物が置換されて1本鎖となる（図2-(5)）。この1本鎖を鑄型として、R A、およびR Aに対するアウタープライマーR 3が更にアニールと相補鎖合成を開始する（図3-(6)）。

- 3 0 -

その結果として生成するR Aからの伸長生成物は、その3'末端F 1を自身に対してアニールすることができる構造を備える（図3-(8)）。なお図3-(6)においては5'末端が自身にアニールしている。しかし5'末端は相補鎖合成の起点とならないことから、この構造では増幅反応を開始することはできない。図3-(6)に対する相補鎖を合成し、更にその3'末端において自身にアニールすることができる構造（図3-(8)）が実現して初めて、増幅反応がスタートする。ここまで反応は、言わば、本発明を構成する増幅反応の準備段階と言える。

続いて、本発明によって達成される核酸の増幅反応について、引き続き図面に基づいて具体的に説明する。自身にアニールした3'末端F 1（図3-(8)）は、相補鎖合成の起点となることができる。このとき3'末端へのアニールはF 1/F 1c間で生じるので、同じくF 1cを持つFAと競合する可能性がある。しかし現実には、同一鎖の隣接する領域に存在する相補的な塩基配列F 1/F 1cは、優先的にアニールする。したがって、自身を錠型とする相補鎖合成反応が優先的に始まる。この反応によって、複数の標的塩基配列が1本鎖上に連結された核酸が合成される。更に、3'末端F 1の自身へのアニールによって形成されたループ領域には、インナープライマーFAがアニールすることができるF 2cが存在しており、ここにFAがアニールして相補鎖合成反応が始まる（図3-(8)）。ループにアニールしたFAからの相補鎖合成反応は、先に自身を錠型として3'末端から開始した相補鎖合成反応の生成物を置換し、その3'末端を再び自身にアニール可能な状態とする（図4-(9)）。この後は、3'末端を起点とする自身を錠型とする相補鎖合成反応と、ループ部分を起点とするインナープライマーFA、またはインナープライマーRAを起点とする相補鎖合成反応が交互に起きる。こうして、自身を錠型として3'末端が繰り返し伸長する反応と、ループ部分からの新たなプライマーによる伸長とが繰り返し生じて、核酸の増幅反応が成立する。

一方、自分自身を錠型として伸長を継続する1本鎖の核酸に対して、そのループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドを合成起点として相補鎖合成される核

- 3 1 -

酸に注目すると、ここでも 1 本鎖上に複数の相補的な塩基配列が連結された核酸の合成が進行している。すなわち、ループ部分からの相補鎖合成は、たとえば図 4-(9)においては、R 1 に達した時点で完了する。そして、この核酸の合成によって置換された 3' 末端を起点として相補鎖合成が始まる（図 4-(9)）。すると、やがてその反応はかつて合成起点であったループ部分に達して再び置換が始まる。こうしてループ部分から合成を開始した核酸も置換され、その結果同一鎖上にアニールすることができる 3' 末端 R 1 を得る（図 4-(11)）。この 3' 末端 R 1 は同一鎖の R 1 c にアニールして相補鎖合成を開始する。さて、この反応の F と R を読みかえれば、図 3-(8)で起きている反応と同じである。したがって図 4-(11)に示す構造は、自身の伸長と新たな核酸の生成を継続する新しい核酸として機能することができる。

以上のように、この方法においては、1 つの核酸の伸長に伴って、これとは別に伸長を開始する新たな核酸を供給しつづける反応が進行する。更に核酸の伸長に伴って、末端のみならず、同一鎖上に複数のループ形成配列がもたらされる。これらのループ形成配列は、鎖置換合成反応により塩基対形成可能な状態となると、インナープライマーがアニールし、新たな核酸の生成反応の起点となる。末端のみならず鎖の途中からの合成反応も組み合わされることにより、さらに効率のよい增幅反応が達成されるのである。以上のように LAMP 法を応用することによって、伸長とそれに伴う新たな核酸の生成が起きる。更に LAMP 法においては、この新たに生成した核酸自身が伸長し、それに付随する更に新たな核酸の生成をもたらす。一連の反応は、理論的には永久に継続し、きわめて効率的な核酸の増幅を達成することができる。しかも本発明の方法は、すべての反応を等温条件のもとで行うことができる。

このとき蓄積する反応生成物は、F 1 - R 1 間の塩基配列とその相補配列が複数連結された構造を持つ。ただし繰り返し単位となっている配列の両端には、F 2 - F 1 (F 2 c - F 1 c)、または R 2 - R 1 (R 2 c - R 1 c) の塩基配列

- 3 2 -

で構成される領域が連続している。たとえば図4-(10)では、5'側から (R 2 - F 2 c) - (F 1 - R 2 c) - (R 1 - F 1 c) - (F 2 - R 2 c) という順序で連結された状態となる。これは、本発明に基づく増幅反応が、インナープライマーを合成起点として F 2 (または R 2) から開始し、続いて自身の 3' 末端を合成起点とする F 1 (または R 1) からの相補鎖合成反応によって伸長するという原理のもとに進行しているためである。

さて、ここでは最も望ましい態様としてループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドにインナープライマー FA、および RA を用いた。しかし本発明による核酸の増幅反応は、これらの限られた構造を持ったオリゴヌクレオチドのみならず、ループからの相補鎖合成を開始できるオリゴヌクレオチドを利用しさえすれば実施することができる。つまり、伸長を続ける 3' 末端はループからの相補鎖合成によって置換されさえすれば、再びループ部分を与える。ループ部分から開始する相補鎖合成は、常に 1 本鎖上に複数の相補的な塩基配列が連結された核酸を鋳型としていることから、本発明で目的としている核酸の合成が可能なことは明らかである。ただし、ここで合成される核酸は、置換後にループを形成して相補鎖合成は行うものの、以降のループを形成するための 3' 末端を持たないため、新たな鋳型としては機能できなくなる。したがって、FA、あるいは RA によって合成を開始した核酸と違って指数的な増幅は期待できない。このような理由から、FA や RA のような構造を持ったインナープライマーは、本発明に基づく高度に効率的な核酸の合成に有用なのである。

一連の反応は、鋳型となる 2 本鎖の核酸に対して、以下の成分を加え、インナープライマーとアウタープライマーのアニールおよび、これらのプライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件下でインキュベートするだけで進行する。インキュベートの条件については先に述べたとおりである。したがって、本発明においては、鋳型となる 2 本鎖核酸の変性に必要な温度よりも低い温度条件下で以下の要素をインキュベートすることによって鋳型核酸の増幅反応が達成さ

- 3 3 -

れる。このとき、鑄型核酸の変性工程は不要である。なお、ここで言う2本鎖核酸の変性に必要な温度とは、急冷の後に鑄型核酸を1本鎖の状態とすることができる温度を言う。

・4種類のオリゴヌクレオチド：

· F A、

R A、

アウタープライマーF 3、

およびアウタープライマーR 3、

・鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼ、

・DNAポリメラーゼの基質となるヌクレオチド

さて、反応原理の説明において述べたように、インナープライマーとして前記F A、およびR Aを用いる場合には、本発明による2本鎖核酸を鑄型とする核酸の合成方法は、試料に由来する核酸を鑄型とする反応において必要となる。F A、およびR Aのような特定の構造を持つインナープライマーを本発明による核酸の合成方法を適用した場合、生じる生成物の3'末端は自身にアニールして自身を鑄型とする相補鎖合成の合成起点となる。また前記生成物の3'末端が自身にアニールすることによって構成されるループ部分にも新たなプライマーがアニールし、合成起点となって鎖置換を伴った相補鎖合成反応が進行する。これらの反応は、本発明による2本鎖核酸を鑄型とする核酸の合成方法には依存することなく進行する。

すなわち、インナープライマーとしてF AおよびR Aを用いる場合には、本発明に基づく2本鎖核酸を鑄型とする核酸の合成反応は初期の反応を構成する。したがって、インナープライマーとアウタープライマーのアニールおよび、これらのプライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件が必要となるのは、初期の反応で、以降の反応のためにより適切な条件を与えることもできる。もつとも、そのために温度の変化を必要とする場合には、2本鎖核酸の変性工程を省

- 3 4 -

略できると言う本発明の特徴を十分に生かすことができない。したがって、初期の反応のみならず、全ての反応を本発明に好適な条件で実施することが好ましい。

本発明においてインナープライマーとして F A、および R A を用いるときは、一連の反応が常に複数の領域の位置関係を維持した状態でなければ進行しないことが重要な特徴である。この特徴によって、非特異的な相補鎖合成に伴う非特異的な合成反応が効果的に防止できるのである。すなわち、たとえ何らかの非特異的な反応が起きたとしても、その生成物が以降の増幅工程に対して出発材料となる可能性を低く押さえることにつながるのである。またより多くの領域によって反応の進行が制御されているということは、類似した塩基配列の厳密な識別を可能とする検出系を自由に構成できる可能性をもたらす。

この特徴を遺伝子変異の検出に利用することができる。本発明におけるアウタープライマーを用いる態様においては、アウタープライマー 2 種、およびインナープライマー 2 種の合計 4 種のプライマーが用いられている。そして 4 種のオリゴヌクレオチドに含まれる 6 領域を構成する塩基配列と標的塩基配列が設計通りでなければ、本発明を構成する相補鎖合成反応のいずれかが阻害される。特に、相補鎖合成の起点となる各オリゴヌクレオチドの 3' 末端付近、および相補配列が合成起点となる X 1 c 領域の 5' 末端付近の塩基配列は相補鎖合成にとって重要である。そこで、これらの相補鎖合成のために重要な塩基配列を検出すべき変異に対応するように設計すれば、本発明による合成反応生成物を観察することによって、塩基の欠失や挿入といった変異の有無、あるいは SNPs のような遺伝子多型を分析することができる。

より具体的には、変異や多型が予想される塩基が、相補鎖合成の起点となるオリゴヌクレオチドの 3' 末端付近、または新たに合成された相補鎖が合成起点となる場合には、相補鎖合成の錫型として作用する側の 5' 末端付近に相当するよう設計するのである。相補鎖の合成起点となる 3' 末端や、その付近にミスマッチが存在すると核酸の相補鎖合成反応は著しく阻害される。LAMP 法において

- 3 5 -

は、反応初期の生成物における末端構造が繰り返し反応を行わなければ高度な増幅反応に結びつかない。したがって、たとえ誤った合成が行われたとしても、増幅反応を構成する相補鎖合成がいずれかの段階で妨げられるのでミスマッチを含んだままでは高度な増幅は起きない。結果的にミスマッチが増幅反応を効果的に抑制し、最終的には正確な結果をもたらすことになる。つまり LAMP 法を利用した核酸の増幅反応は、より完成度の高い塩基配列のチェック機構を備えていると言うことができる。これらの特徴は、たとえば単純に 2 つの領域で増幅反応を行っている PCR 法などでは期待しにくい利点である。

更に本発明に用いるオリゴヌクレオチドを特徴付ける領域 X 1 c は、相補配列が合成されてはじめて合成起点となり、この相補配列が、新たに合成された同一鎖内の配列 X 1 にアニールすることにより、自己を鑄型とする合成反応が進行する。このため、たとえ先行技術でしばしば重要な問題となるいわゆるプライマーダイマーを生成しても、本オリゴヌクレオチドはループを形成しない。したがって、プライマーダイマーに起因する非特異的な増幅は原理的に生じ得ず、反応の特異性向上に貢献している。

インナープライマー F A に対して、アウタープライマーの  $T_m$  を（アウタープライマー F 3 : F 3 c )  $\leq$  (F 2 c / F 2) となるように設計することにより、核酸の増幅を効率的に行うことができる。F A を構成する各領域については、

(F 1 c / F 1) 間のアニールが (F 2 c / F 2) よりも優先的におきるようにデザインするのが望ましい。デザインに当たっては、 $T_m$  や構成塩基等を考慮する。更に、F 1 c / F 1 間のアニールが分子内の反応なので優先的に進む可能性が高いことも考慮する。同様の条件は、F A の伸長生成物にアニールする R A の設計においても考慮すべきであることは言うまでもない。このような関係とすることにより、確率的に理想的な反応条件を達成することができる。

本発明においては核酸の合成(synthesis)と増幅(amplification)という用語を用いる。本発明における核酸の合成とは、合成起点となったオリゴヌクレオチド

- 3 6 -

からの核酸の伸長を意味する。合成に加えて、更に他の核酸の生成と、この生成された核酸の伸長反応とが連続して起きるとき、一連の反応を総合して增幅という。

さて、インナープライマーとしてF A、およびR Aを用いることにより、3'末端に同一鎖上的一部F 1 cにアニールすることができる領域F 1を備え、この領域F 1が同一鎖上のF 1 cにアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域F 2 cを含むループを形成することができる1本鎖核酸が生成される。この1本鎖核酸は、以降の核酸増幅反応において重要な出発物質として機能する。このような1本鎖核酸は、次のような原理に基づいて供給することもできる。すなわち、インナープライマーとして予め次のような構造を持ったプライマーに基づいて相補鎖合成を進めるのである。

5' - [プライマー内に位置する領域X 1 cにアニールする領域X 1] - [塩基対結合が可能な状態にあるループ形成配列] - [領域X 1 c] - [鋳型に相補的な配列を持つ領域] - 3'

鋳型に相補的な配列を持つ領域には、F 1に相補的な塩基配列（プライマーF A）およびR 1 cに相補的な塩基配列（プライマーR A）の2種類を用意する。なお、このとき合成すべき核酸を構成する塩基配列は、領域F 1から領域R 1 cにいたる塩基配列と、この塩基配列に相補的な塩基配列を持つ領域R 1から領域F 1 cにいたる塩基配列とを含むものである。一方、プライマー内部でアニールすることができるX 1 cとX 1は、任意の配列とすることができる。ただしプライマーF AとR Aの間では、領域X 1 c/X 1の配列を異なるものとするのが望ましい。

まず、鋳型となる2本鎖核酸の領域F 2を任意のプライマーによって塩基対結合が可能な状態とする。そして塩基対結合が可能になったF 2にプライマーF Aをアニールさせ、相補鎖合成を行う。このとき、任意のプライマーにはR Aを用いることができる。次いで合成された相補鎖の領域R 2 cを塩基対結合が可能な

- 3 7 -

状態とし、ここに一方のプライマーをアニールさせて相補鎖合成の起点とする。このとき合成される相補鎖の 3' 末端は、最初に合成された鎖の 5' 末端部分を構成するプライマー F A に相補的な塩基配列を持つので、3' 末端には領域 X 1 を持ち、これが同一鎖上の領域 X 1 c にアニールするとともにループを形成する。こうして、前記本発明による特徴的な 3' 末端構造が提供され、以降の反応は最も望ましい態様として示した先の反応系そのものとなる。なおこのときループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドは、3' 末端にループ内に存在する領域 X 2 c に相補的な領域 X 2 を持ち、5' 末端には領域 X 1 を持つものとする。先の反応系ではプライマー F A と R A を使って鑄型核酸に相補的な鎖を合成することによって核酸の 3' 末端にループ構造をもたらした。この方法は、短いプライマーで効果的に本発明に特徴的な末端構造を提供する。一方、本態様においては、プライマーとしてはじめからループを構成する塩基配列全体を提供しており、より長いプライマーの合成が必要となる。

この他、たとえば SDA や NASBA のような公知の核酸增幅方法に対しても本発明の原理を適用することができる。SDA の原理を本発明に応用するには、SDA 用のプライマーのセット、鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼ、制限酵素、および相補鎖合成に必要な基質（ヌクレアーゼ耐性とするためのチオ化ヌクレオチドを含む）を、鑄型となる 2 本鎖核酸とともに、前記本発明のための条件下でインキュベートする。SDA 用プライマーのいずれかが、2 本鎖の不安定化によって相補鎖合成を開始すれば、置換された鑄型核酸において、他方のプライマーがアニールすべき領域が塩基対結合が可能な状態となる。そしてプライマーのアニールと鑄型核酸に対する相補鎖合成が行われる。

次にこのプライマーに対するアウタープライマーのアニールと相補鎖合成が起き、先に SDA 用プライマーから合成された相補鎖が置換されて 1 本鎖の核酸を生じる。なお前記任意のプライマーによる相補鎖合成は、鑄型核酸における 5' 側方向に進行する。したがって、SDA 用プライマーがアニールすべき領域のみなら

- 3 8 -

ず、アウタープライマーがアニールすべき領域も塩基対結合が可能な状態となる。この1本鎖核酸を鋳型として他方のプライマーから合成される相補鎖はヌクレアーゼ耐性である。したがって、制限酵素認識部位に対する制限酵素の作用はプライマー側にのみに作用し、ニックが生じる。このニックを合成起点として、相補鎖合成と置換とが繰り返し行われ増幅が達成される。更に、このとき置換によって生成する1本鎖核酸にも SDA用プライマーがアニールして相補鎖の合成が行われる。

このとき鋳型となる核酸はヌクレアーゼ耐性であるが、SDA用プライマーはヌクレアーゼ耐性ではないので、やはり制限酵素によるニックが生じる。その結果、置換された1本鎖核酸においても、核酸の増幅反応が達成される。したがって、この状態でインキュベートを続けることによって、SDA用プライマーによって規定される領域の塩基配列からなる2本鎖のDNAが次々と合成される結果、核酸の増幅が達成される。SDA法の原理は既に公知であるが、2本鎖の不安定化に基づく核酸の合成反応を利用して、反応を開始させることによって、2本鎖核酸の変性工程を省くことが可能となることは、本発明によてもたらされた新規な知見である。

また本発明に基づいてNASBA法を実施するには、NASBA用プライマーが鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼとRNAポリメラーゼと組み合わせて用いられる。NASBA用プライマーは、プロモーター配列を附加した第1プライマーと、このプライマーを起点として合成された相補鎖に対してアニールする第2プライマーとで構成される。

まず2本鎖の鋳型核酸に対して任意のプライマーによる相補鎖合成を行い、第1のNASBA用プライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする。続いて第1のNASBA用プライマーを起点として合成された相補鎖を、アウタープライマーによって置換することにより1本鎖とする。得られた1本鎖に第2のNASBA用プライマーをアニールさせて2本鎖とすれば、第1のNASBA用プライマ

- 3 9 -

一に付加したプロモーター領域が2本鎖として完成する。2本鎖となったプロモーター領域によってRNAポリメラーゼによる転写反応が開始され、標的塩基配列を鋳型とするRNA合成が行われる。

本発明による核酸の合成方法、あるいは増幅方法に必要な各種の試薬類は、あらかじめパッケージングしてキットとして供給することができる。具体的には、本発明のために、インナープライマーおよびアウタープライマーとして必要な各種のオリゴヌクレオチド、相補鎖合成の基質となるdNTP、鎖置換とともに相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液、更に必要に応じて合成反応生成物の検出のために必要な試薬類で構成されるキットが提供される。特に、本発明の望ましい態様においては、反応途中で試薬の添加が不要なことから、1回の反応に必要な試薬を反応容器に分注した状態で供給することにより、サンプルの添加のみで反応を開始できる状態とすることが可能である。発光シグナルや蛍光シグナルを利用して、反応生成物の検出を反応容器のままで行えるようなシステムとすれば、反応後の容器の開封を全面的に廃止することができる。これは、コンタミネーションの防止上、たいへん望ましいことである。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の望ましい態様の反応原理の一部(1)-(2)を示す模式図である。

図2は、本発明の望ましい態様の反応原理の一部(3)-(5)を示す模式図である。

図3は、本発明の望ましい態様の反応原理の一部(6)-(8)を示す模式図である。

図4は、本発明の望ましい態様の反応原理の一部(9)-(11)を示す模式図である。

図5は、HBV、HCV、PSA遺伝子配列の増幅反応後の電気泳動ゲル写真である。

図6は、Betaineの有無での増幅反応後の電気泳動ゲル写真である。

図7は、プロリン、DMSO存在下での増幅反応後の電気泳動ゲル写真である。

- 4 0 -

図8は、本発明による核酸の増幅方法に及ぼす、アウタープライマーの影響を観察した結果を示すグラフである。縦軸は蛍光強度を、横軸は反応時間を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

##### [実施例1] HBV、HCV、PSA 遺伝子配列の増幅

HBV、HCV、およびPSA 遺伝子の部分配列をそれぞれプラスミドに組み込んだDNA（2本鎖）を鋳型として、本発明による核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプライマーは、Inner F、Inner R、Outer F、そしてOuter R の4種類である。Outer F と Outer R は、それぞれ Inner F と Inner R を合成起点として得られた第1の核酸を置換するためのアウタープライマーである。

Inner F（あるいはInner R）のアニールが優先的に起こるようにこれらのプライマー濃度を高く設定した。プラスミドに組みこまれた HBV、HCV、およびPSA に由来する本実施例の鋳型配列を、各々配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 に示した。さらに、各々の鋳型を増幅するのに用いたプライマーの配列（Inner F、Inner R、Outer F、Outer R）を以下に示す。

・HBV：

Inner F（配列番号：4）：

5' - GATAAAACGCCGCAGACACATCCTTCCAACCTCTTCCTCAA -3'

Inner R（配列番号：5）：

5' - CCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGACAAACGGGCAACATACCTT -3'

Outer F（配列番号：6）： 5' - CAAAATTGCGAGTCCCCAAC -3'

Outer R:（配列番号：7） 5' - GGTGGTTGATGTTCTGGAA -3'

・HCV：

Inner F（配列番号：8）：

5' - GAGTGGGTTTATCCAAGAAAGGACTTTAGCCATAGTGGTCTGCGGA -3'

- 4 1 -

Inner R (配列番号 : 9) :

5' - CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCTTGCACTCGCAAGCACCCCTATC -3'

Outer F (配列番号 : 10) : 5' - GCAGAAAGCGTCTAGCCATGG -3'

Outer R (配列番号 : 11) : 5' - CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGC -3'

・PSA :

Inner F (配列番号 : 12) :

5' - TGTCCTGATGCAGTGGCAGCTTAGTCTGCCGGGTGTTCTG -3'

Inner R (配列番号 : 13) :

5' - TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG -3'

Outer F (配列番号 : 14) : 5' - TGCTTGTCGGCTCTCGTG -3'

Outer R (配列番号 : 15) : 5' - GGGTGTGTGAAGCTGTG -3'

また、プライマーの構造的な特徴を以下にまとめた。

Inner F :

プライマー 5' 側の領域 / 3' 側の領域

Inner F Inner F による合成相補鎖の領域 F1c と同じ

/ 銄型 DNA の領域 F2c に相補

Inner R Inner R による合成相補鎖の領域 R1c と同じ

/ Inner F による合成相補鎖の領域 R2c に相補

Outer F 銄型 DNA の領域 F2c の 3' 側に隣接する F3c に相補

Outer R Inner F による合成相補鎖の領域 R2c の 3' 側に隣接する R3c に相補

このようなプライマーによって、個々の遺伝子の部分配列を組み込んだ領域 F1c から R1c にいたる領域とその相補的な塩基配列とが、F2c を含むループ形成配列を挟んで 1 本鎖上で複数連結した核酸が合成される。これらのプライマーによる本発明による核酸の合成方法のための反応液組成を以下に示す。

・反応液組成 (25 μL 中)

20 mM Tris-HCl pH 8.8

- 4 2 -

10 mM KCl

10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4 mM MgSO<sub>4</sub>

1 M Betaine

0.1% Triton X-100

0.4 mM dNTP

8 U Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND BioLabs)

プライマー：

1600 nM Inner F

1600 nM Inner R

400 nM Outer F

400 nM Outer R

錆型：

$1 \times 10^{-20}$  mol HBV DNA

$1 \times 10^{-17}$  mol HCV DNA

$1 \times 10^{-22}$  mol PSA DNA

錆型には熱変性をしないものを用意した。反応液を 65°C で 1 時間反応させた。

反応の確認：上記反応液の 5 μL に 5 μL の loading buffer を添加し、2% アガロースゲル (0.5% TBE) を使って、0.5 時間、100 V で電気泳動した。分子サイズマーカーとして、φX174 Hae III を使用した。泳動後のゲルをエチジウムプロマイド（以下、EtBr と省略する）で染色して核酸を確認した。結果は図 6 に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに対応している。

レーン 1 : φX174 Hae III

レーン 2 : DNA (+), PSA

レーン 3 : DNA (-), PSA

レーン 4 : DNA (+), HBV

- 4 3 -

レーン 5 : DNA (-), HBV

レーン 6 : DNA (+), HCV

レーン 7 : DNA (-), HCV

実験の結果、HBV、HCV、およびPSAいずれのDNAを錆型に用いた場合でも、本発明のインナープライマーによる増幅生成物に特徴的なラダーが観察された。インナープライマーにアウタープライマーを組み合わせることにより、2本鎖核酸を錆型として等温条件下で核酸の合成が可能であることが確認された。

[実施例2] ベタイン存在下での増幅

HCV遺伝子の部分配列をプラスミドに組み込んだDNA( $1 \times 10^{-17}$  mol)を錆型として、本発明による核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプライマーは、Inner F、Inner R、Outer F、そしてOuter Rの4種類である。このとき、上記、反応液組成中のBetaineを含まない反応液も同時に作成した。

錆型は熱変性をしないものを用意した。反応液を65°Cで1および2時間反応させた。

反応の確認：上記反応液の5μLに5μLのloading bufferを添加し、2%アガロースゲル(0.5%TBE)を使って、0.5時間、100Vで電気泳動した。分子サイズマーカーとして、 $\phi$ X174 Hae IIIを使用した。泳動後のゲルをEtBrで染色して核酸を確認した。結果は図7に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに対応している。

レーン 1 :  $\phi$ X174 Hae III

レーン 2 : DNA (-), Betaine (-), 1h

レーン 3 : DNA (+), Betaine (-), 1h

レーン 4 : DNA (-), Betaine (+), 1h

レーン 5 : DNA (+), Betaine (+), 1h

レーン 6 :  $\phi$ X174 Hae III

レーン 7 : DNA (-), Betaine (-), 2h

- 4 4 -

レーン 8 : DNA (+), Betaine (-), 2h

実験の結果、反応時間 1 時間では、ベタイン存在下でのみ增幅が見られた。一方、反応時間を 2 時間に延ばした場合、ベタイン非存在下でも増幅が見られた。すなわち、一般的な反応系においても増幅が見られることが確認できた。

〔実施例 3〕 プロリン、または DMSO 存在下での増幅

HCV 遺伝子の部分配列をプラスミドに組み込んだ DNA ( $1 \times 10^{-17}$  mol) を鋳型として、本発明による核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプライマーは、Inner F、Inner R、Outer F、および Outer R の 4 種類である。

ベタインのかわりに、プロリンあるいは DMSO を終濃度が 1%あるいは 5%になるように反応液に加えた。その他の反応液組成は上記と同じである。

鋳型は熱変性をしないものを用意し、反応液を 65°Cで 2 時間反応させた。

反応の確認：上記反応液の  $5\mu\text{L}$  に  $5\mu\text{L}$  の loading buffer を添加し、2%アガロースゲル (0.5% TBE) を使って、0.5 時間、100 V で電気泳動した。分子サイズマーカーとして、 $\phi$ X174 Hae III を使用した。泳動後のゲルを EtBr で染色して核酸を確認した。結果は図 8 に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに對応している。

レーン 1 :  $\phi$ X174 Hae III

レーン 2 : proline (+)

レーン 3 : DMSO (+)

レーン 4 : Betaine (-)

ベタインと同様な効果（融解温度低下作用）を持つプロリンあるいは DMSO を用いて増幅反応を行った結果、プロリンあるいは DMSO を使用しても増幅反応が進むことを確認できた。

〔実施例 4〕 アウタープライマーの影響

直鎖上の DNA である lambda DNA (配列番号 : 1 6、 $1 \times 10^6$  molecule) を標的塩基配列として、本発明による核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプラ

- 4 5 -

イマーは、Inner F、Inner R、Outer F、そして Outer R の 4 種類である。このうち、Outer F、Outer R プライマーを除いた反応も同時に行つた。いずれの反応系にも終濃度  $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるようにエチジウムプロマイド (EtBr) を加えた。

ターゲットには熱変性しないものを用意し、反応液を  $65^\circ\text{C}$  で 1.5 時間反応させて、ABI 7700 (パーキンエルマ-製) を用いて経時的に蛍光強度の変化を観察した。EtBr は 2 本鎖核酸特異的な蛍光染色剤である。したがつて、核酸の増幅によって生成する 2 本鎖核酸の量に応じて傾向強度が増強する。

測定結果を図 9 に示す。アウタープライマーを除いた反応系では増幅速度が遅くなっていることがわかつた。

#### lambda-DNA プライマーの塩基配列

Inner F (配列番号 : 17) :

CAGCCAGCCGCAGCACGTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGAGCCGC

Inner R (配列番号 : 18) :

GAGAGAATTGTACCACTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCTAGGGACAGT

Outer F (配列番号 : 19) :

GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT

Outer R (配列番号 : 20) :

GGACGTTGTAATGTCCGCTCC

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、反応の特異性や効率を犠牲にすることなく、温度変化を省略可能な核酸の合成方法が提供された。本発明は 2 本鎖核酸を錫型として用いるのにもかかわらず、変性のための温度変化を必要としない。そのため、特殊な温度制御機構を備えた装置を用いることなく、核酸の合成を実施することができる。また温度サイクルを不要とする本発明によれば、温度変化に起因する非特異反応を防ぐ効果が期待できる。

- 4 6 -

本発明による核酸の合成方法は、プライマーを合成起点とするあらゆる原理の核酸合成方法に応用することができる。特に、もともと温度変化工程を必要としない原理に基づいた核酸の合成反応との組み合わせにより、より高度な合成効率を達成することができる。たとえば実施例に示したような、自身の一部に 3' 末端領域がアニールすることができる構造を備えた増幅生成物を与える核酸の増幅方法は、本発明との組み合わせにより操作性と特異性に優れた核酸の増幅方法となる。この組み合わせにおいては、錫型となる 2 本鎖核酸を、プライマーと DNA ポリメラーゼとともに所定の温度でインキュベートするのみで、高度な増幅が達成できる。本発明によって、高度な特異性と高い増幅効率を維持しつつ、しかも温度変化の不要な核酸の増幅方法が可能となった。

本発明に基づく核酸の合成方法は、温度変化が不要となったことによって反応のモニタリングが容易となる。すなわちこの反応の進行をモニタリングするには、一定の温度を与えるインキュベーション機構と、光学的な読み取り機構を備える装置が用いられる。このような機構は、汎用の光学的分析装置が備えている一般的な機構である。したがって、本発明に基づく核酸の増幅方法は、汎用の分析装置によるモニタリングが可能である。

以上のように、本発明による核酸の合成方法は、PCR 法等の公知の方法の問題点である複雑な温度制御を完全に不要とし、実験操作を著しく簡略化する。また本発明は、温度制御のための特殊な装置を必要としない、汎用性に優れる核酸の増幅方法を実現する。更に本発明においては、温度変化に起因する非特異的な反応を防止することができる。

## 請求の範囲

1. 次の工程を含む 2 本鎖核酸を鋳型とする核酸の合成方法。
  - a) 2 本鎖からなる鋳型核酸と任意のプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼとともに前記 2 本鎖核酸とインキュベートすることによって、標的鋳型核酸における等温で鋳型核酸を増幅することができるプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程、
  - b) 工程 a) において塩基対結合が可能な状態となった領域に、等温で鋳型核酸を増幅することができるプライマーをアニールさせる工程、および
  - c) 前記プライマーを合成起点として相補鎖合成を行う工程
2. 工程 a) を融解温度調整剤の存在下で行う請求項 1 に記載の方法。
3. 融解温度調整剤が、ペタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルアミン N-オキシドからなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物である請求項 2 に記載の方法。
4. 以下の工程を含む相補的な塩基配列で構成される 2 本鎖の鋳型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸の合成方法。
  - a) 2 本鎖からなる鋳型核酸と任意のプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼとともに前記 2 本鎖核酸とインキュベートすることによって、標的鋳型核酸における第 2 のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程、
  - b) 工程 a) において塩基対結合が可能となった領域に第 2 のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第 2 のプライマーはその 3' 末端において前記特定の領域を構成する一方の

- 4 8 -

鎖の 3' 側を規定する領域に対してアニールし、かつ第 2 のプライマーの 5' 末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

- c) 工程 b) で合成された第 2 のプライマーの伸長産物における第 1 のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程；ここで第 1 のプライマーはその 3' 末端において前記第 2 のプライマーを起点とする伸長産物における前記特定の領域の 3' 側を規定する領域に対してアニールする、
- d) 工程 c) において塩基対結合が可能となった領域に第 1 のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程、および
- e) 工程 d) によって合成された第 1 のプライマーの伸長生成物の 3' 末端を自身にアニールさせることによって自身を鋳型とする相補鎖合成を行い、前記特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を得る工程

5. 工程 a) における任意のプライマーが第 1 のプライマーである請求項 4 に記載の方法。
6. 工程 c) が、鋳型における第 2 のプライマーの 3' 側を起点とする第 4 のプライマーの相補鎖合成反応による置換によって行われる請求項 4 に記載の方法。
7. 工程 e) が、鋳型における第 1 のプライマーがアニールすべき領域の 3' 側を起点とする第 3 のプライマーの相補鎖合成反応による置換によって第 1 のプライマーの伸長生成物を 1 本鎖とする工程を含む請求項 4 に記載の方法。
8. 第 1 のプライマーが、その 5' 末端に、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである請求項 4 に記載の方法。
9. 以下の工程を含む、相補的な塩基配列で構成される 2 本鎖の鋳型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を増幅する方法。

- 4 9 -

- 1) 請求項 7 に記載の方法によって生成された第 1 のプライマーの伸長生成物の 3' 末端を自身にアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程、
- 2) 3' 末端の自身へのアニールによって形成されるループ領域に第 2 のプライマー、または第 1 のプライマーをアニールさせてそれを起点とする相補鎖合成を行う工程、
- 3) 工程 2) の相補鎖合成反応によって自身の 3' 末端からの伸長生成物を置換し、その 3' 末端を塩基対結合が可能とする工程、
- 4) 工程 3) によって塩基対結合が可能となった 3' 末端を起点とし自身を錫型とする相補鎖合成反応を行うことによって、工程 2) でループ領域を起点として合成された相補鎖を置換して 1 本鎖の核酸を生成する工程、  
および
- 5) 工程 2) - 4) を繰り返して目的とする核酸を増幅する工程、

10. 更に次の工程を含む、請求項 9 に記載の方法。

- 6) 工程 4) によって生成する 1 本鎖の核酸の 3' 末端を自身にアニールさせて相補鎖合成反応を行う工程、
- 7) 3' 末端の自身へのアニールによって形成されるループ領域に第 2 のプライマー、または第 1 のプライマーをアニールさせてそれを起点とする相補鎖合成を行う工程、
- 8) 工程 7) の相補鎖合成反応によって自身の 3' 末端からの伸長生成物を置換し、その 3' 末端を塩基対結合が可能とする工程、
- 9) 工程 8) によって塩基対結合が可能となった 3' 末端を起点とし自身を錫型とする相補鎖合成反応を行うことによって、工程 7) でループ領域を起点として合成された相補鎖を置換して 1 本鎖の核酸を生成する工程、  
および
- 10) 工程 7) - 9) を繰り返して目的とする核酸を増幅する工程、

- 5 0 -

11. 請求項 10 に記載の増幅方法を行い、増幅反応生成物が生じたかどうかを観察することにより試料中の標的塩基配列を検出する方法。
12. 核酸の検出剤存在下で請求項 10 に記載の方法を行い、検出剤のシグナル変化に基づいて増幅反応生成物が生じたかどうかを観察する請求項 11 に記載の方法。
13. 請求項 11 に記載の検出方法によって変異を検出する方法であって、増幅対象である塩基配列における変異が、増幅方法を構成する相補鎖合成の起点となる少なくとも 1 つの 3' 末端において、相補鎖合成を妨げるものである方法。
14. 次の要素を、第 1 のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下でインキュベートする工程からなる、相補的な塩基配列で構成される 2 本鎖の鑄型核酸の特定の領域を構成する塩基配列が 1 本鎖上に複数連結された核酸を増幅する方法。
  - ・ 増幅すべき特定の領域を含む 2 本鎖からなる標的鑄型核酸
  - ・ 鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼ
  - ・ 第 1 のプライマー；ここで第 1 のプライマーはその 3' 末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の 3' 側を規定する領域に対してアニール、かつ第 1 のプライマーの 5' 末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える、
  - ・ 第 2 のプライマー；ここで第 2 のプライマーはその 3' 末端において前記特定の領域を構成する一方の鎖の 3' 側を規定する領域に対してアニール、かつ第 2 のプライマーの 5' 末端には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える、
  - ・ ヌクレオチド基質
15. 更に付加的に次の要素を存在させる請求項 14 に記載の方法。
  - ・ 第 3 のプライマー；ここで第 3 のプライマーは、鑄型における第 1 のプライマーがアニールすべき領域の 3' 側を起点とする相補鎖合成反応の起点と

- 5 1 -

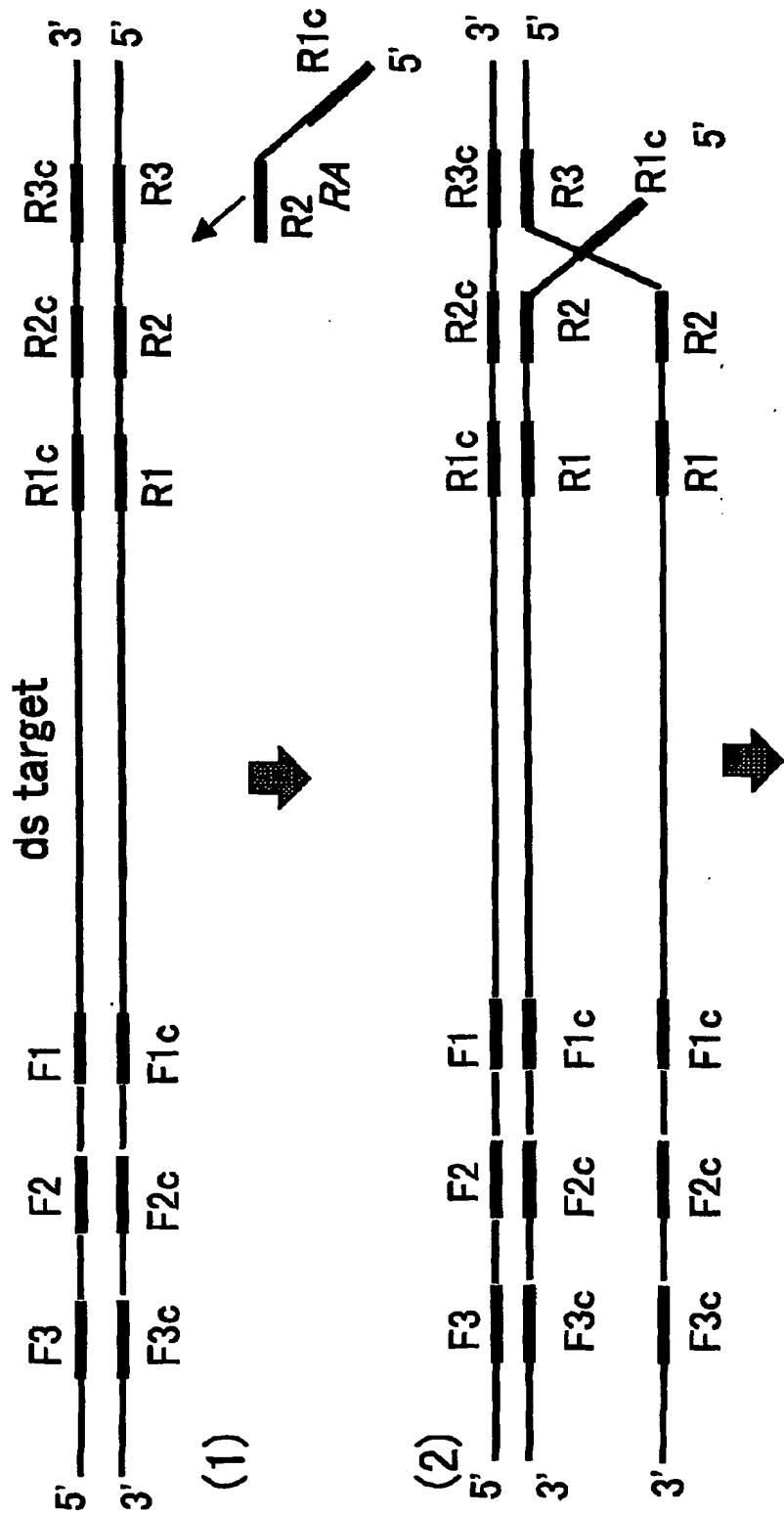
なる、および

- ・第4のプライマー；ここで第4のプライマーは、鑄型における第2のプライマーがアニールすべき領域の3'側を起点とする相補鎖合成反応の起点となる、

16. 融解温度調整剤の存在下でインキュベートする請求項14に記載の方法。
17. 融解温度調整剤が、ペタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルアミンN-オキシドからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である請求項16に記載の方法。
18. 2本鎖からなる鑄型核酸、任意のプライマー、および等温で鑄型核酸を増幅することができるプライマーを、この任意のプライマーを起点とする相補鎖合成が可能な条件下で鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼとともにインキュベートする工程を含む、標的鑄型核酸における等温で鑄型核酸を増幅する反応を開始するプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする方法。

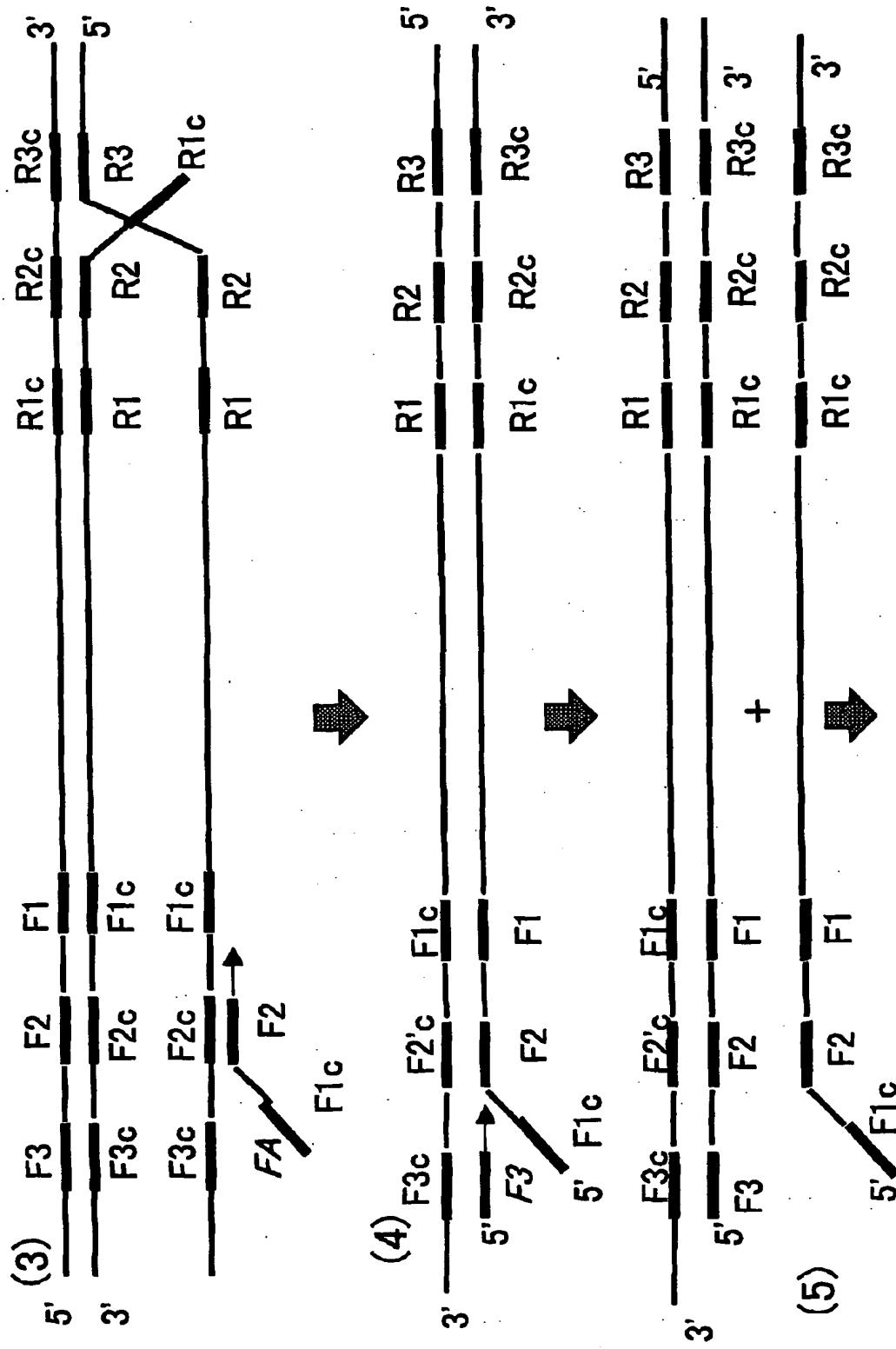
1 / 8

図 1



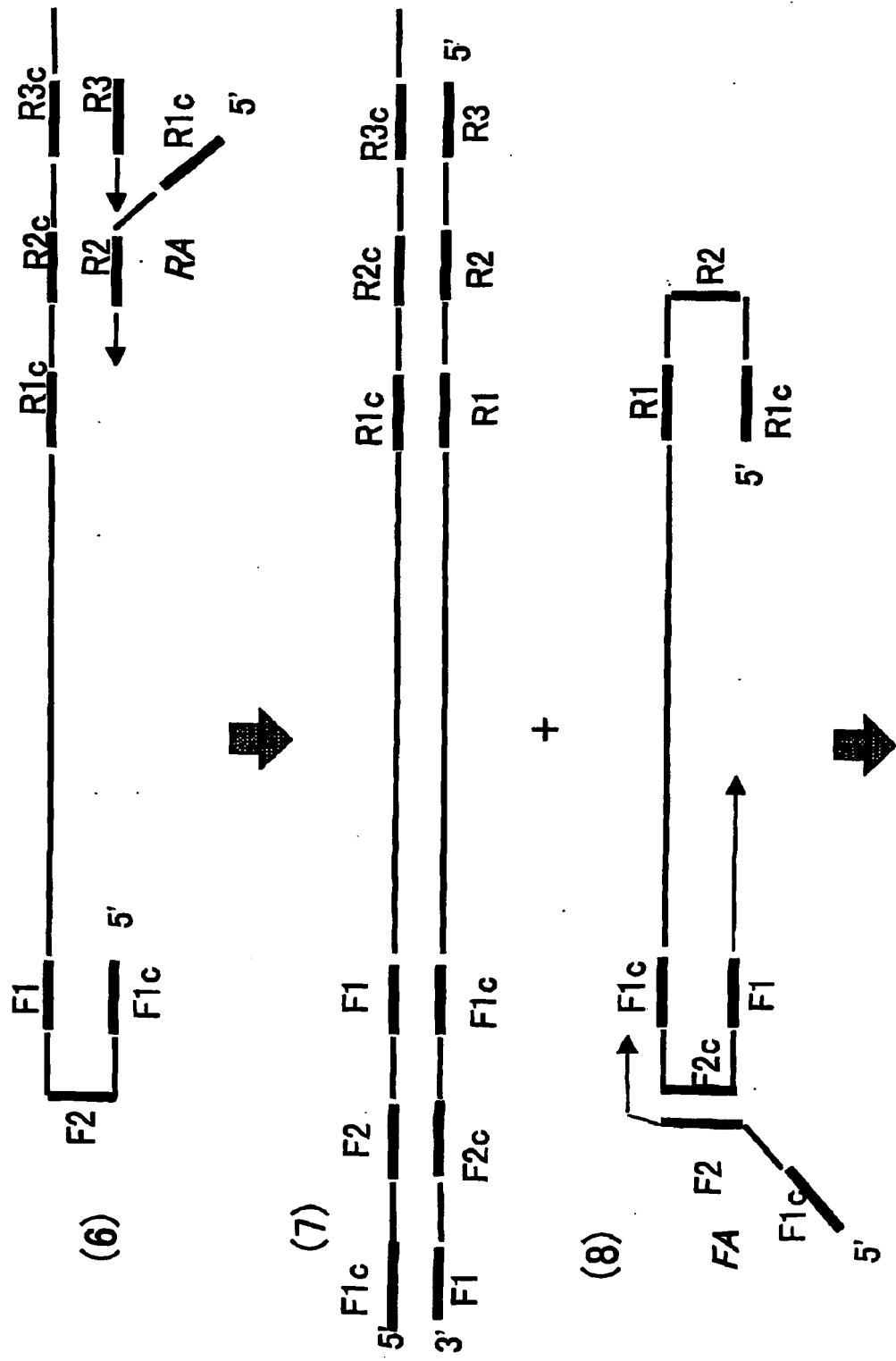
2 / 8

図 2



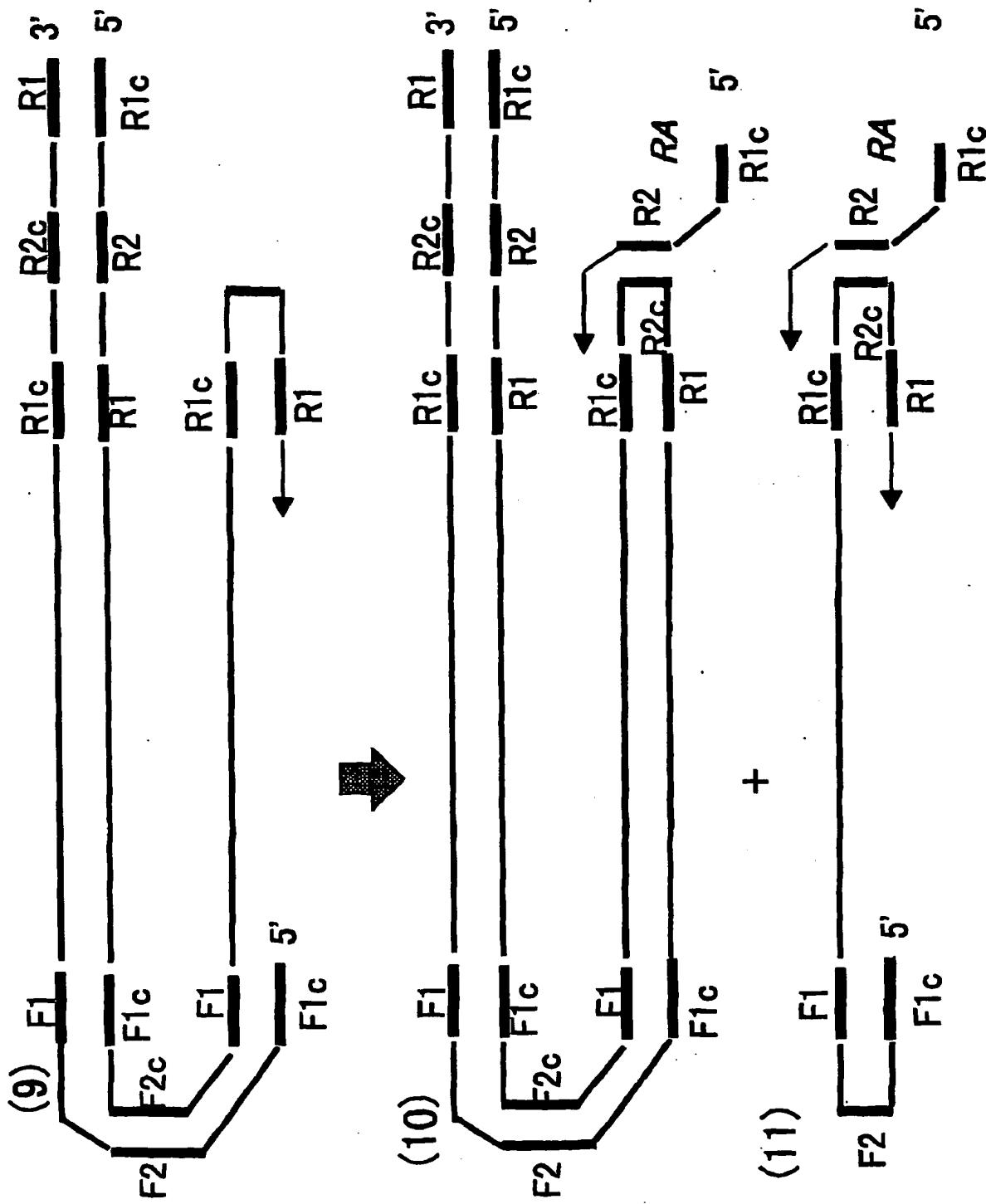
3 / 8

図 3



4 / 8

図 4



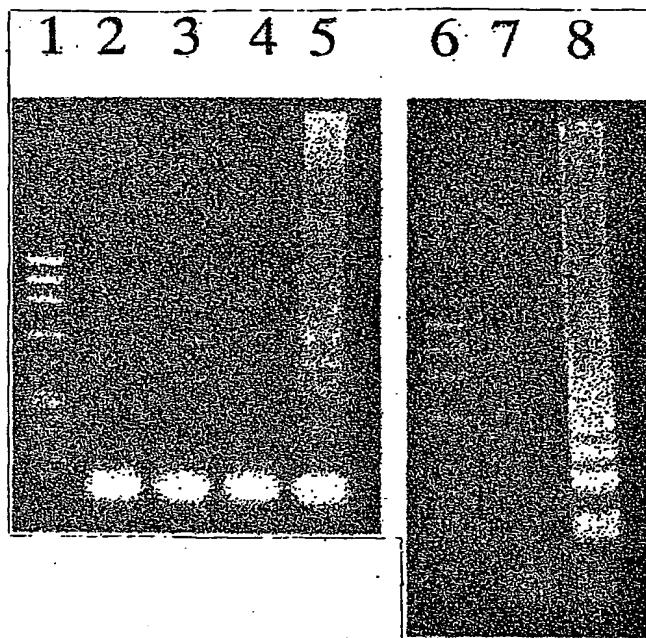
5 / 8

図 5



6 / 8

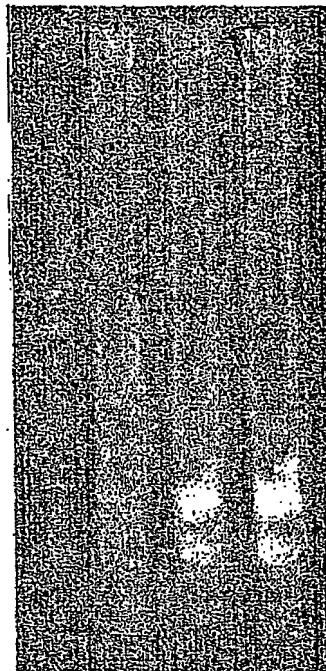
図 6



7 / 8

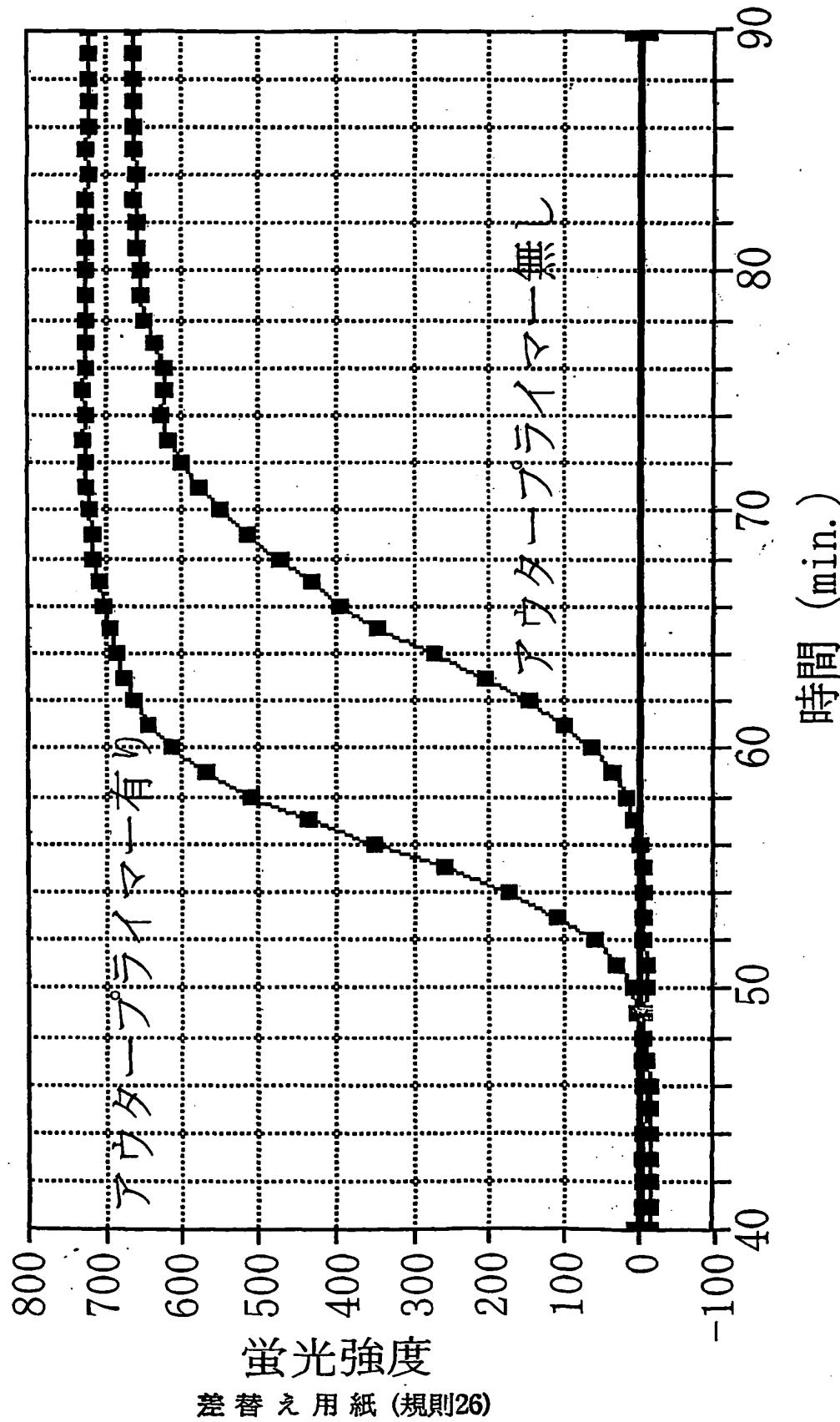
図 7

1 2 3 4



8 / 8

図 8



## SEQUENCE LISTING

<110> Eiken Chemical Co., Ltd.

<120> Method for synthesis of nucleic acid using double  
strand nucleic acid as template.

<130> E2-A0001P

<140>

<141>

<150> JP 2000-111939

<151> 2000-04-07

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 198

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 1

caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac tcaccaacct cttgtcctcc aatttgtcct 60

2/10

ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgaaaa atcatattcc tcttcacatcct gctgctatgc 120  
ctcatcttct tggtggttct tctggactac caaggtatgt tgcccggttg tcctctactt 180  
ccaggaacat caaccacc 198

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 279

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 2

gcagaaaagcg tctagccatg gcgttagtat gagtgtcgta cagcctccag gcccccccct 60  
cccgaggagag ccatagtggt ctgcggaaacc ggtgagtaca ccggaaattac cgaaaaagact 120  
gggtccttcc ttggataaac ccactctatg tccggtcatt tgggcgtgcc cccgcaagac 180  
tgctagccga gtagcgttgg gttgcgaaag gccttgtggt actgcctgat agggtgcttgc 240  
cgagtcccccc gggagggtctc gtagaccgtg catcatgag 279

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

tgcgggtggc ctctcggtggc agggcagttct gcggcggtgt tctgggtgcac ccccaagtggg 60  
tcctcacagc tgcccaactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120  
tggtttcatcc tgaagacaca ggccaggtat ttcaaggtag ccacagcttc acacaccc 178

3/10

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gataaaaacgc cgcaagacaca tccttccaac ctcttgtcct ccaa

44

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cctgctgtcta tgcctcatct tctttgacaa acgggcaaca tacctt

46

<210> 6

<211> 20

4/10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

caaaattcgc agtcccaac

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggtgtttgat gttcctgga

19

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5/10

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 8

gagtgggttt atccaagaaa ggacttttagc catagtggtc tgcgga

46

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 9

ctagccgagt agcggtgggt tgctttgcac tcgcaagcac cctatc

46

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

6/10

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

gcagaaaagcg tcttagccatg g

21

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

ctagccgagt agcggtgggt tgc

23

<210> 12

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

7/10

&lt;400&gt; 12

tgttcctgat gcagtggca gcttagtct gcggcggtgt tctg

44

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 13

tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaataccctg gcctg

45

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 14

8/10

tgcttgtggc ctctcgta 18

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gggtgtgtga agctgtg

17

<210> 16

<211> 245

<212> DNA

<213> Bacteriophage lambda

<400> 16

ggcttggctc tgctaacaacg ttgctcatag gagatatggc agagccgcag acacgtcgta 60  
tgcaggaaacg tgctcggtgc ggctgggtgaa cttccgatag tgcgggtgtt gaatgatttc 120  
cagttgctac cgattttaca tatttttgc atgagagaat ttgtaccacc tcccaccgac 180  
catctatgac tgtacgccac tgtccctagg actgctatgt gccggagcgg acattacaaa 240  
cggtcc 245

9/10

<210> 17

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgc 46

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

gagagaattt gtaccacctc ccaccggca catagcagtc ctagggacag t 51

<210> 19

<211> 22

10/10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

ggcttggctc tgctaacacg tt

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

ggacgtttgt aatgtccgct cc

22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02771

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl' C12N 15/10, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl' C12N 15/10, C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	NOTOMI, T. et al., "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", Nucleic Acids Res. (June, 2000), Vol.28, No.12, page E63	1-18
P, X	Tsugunori IRITOMI et al., "Shinki Idenshi Zofuku hou (LAMP hou) no Genri to Ouyou", Bio Industry (February, 2001), Vol.18, No.2, pages 15 to 23	1-18
P, X	WO, 00/28082, A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 18 May, 2000 (18.05.00), & EP, 1020534, A1	1-18
P, X	WO, 01/34790, A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 17 May, 2001 (17.05.01) (Family: none)	1-18
P, X	WO, 01/34838, A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 17 May, 2001 (17.05.01) (Family: none)	1-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 18 June, 2001 (18.06.01)	Date of mailing of the international search report 26 June, 2001 (26.06.01)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02771

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/00330, A2 (HIMMLER, G.), 03 January, 1997 (03.01.97), & AT, 9501007, A & AU, 9658872, A & ZA, 9605019, A & EP, 833942, A2 & JP, 11-509406, W & US, 6033881, A & DE, 59605824, G	1-18

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/10, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/10, C12Q 1/68

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	NOTOMI, T. et al. "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", Nucleic Acids Res. (2000. Jun) Vol. 28, No. 12, p. E63	1-18
P, X	納富 繼宣 他「新規遺伝子増幅法（LAMP法）の原理と応用」 Bio Industry(2001. Feb.) Vol. 18, No. 2, p. 15-23	1-18
P, X	WO, 00/28082, A1 (榮研化学株式会社) 18. 5月. 2000 (18. 05. 00) & EP, 1020534, A1	1-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

18. 06. 01

## 国際調査報告の発送日

26.06.01

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二



4 B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 01/34790, A1 (榮研化学株式会社) 17.5月. 2001(17.05.01) (ファミリーなし)	1-18
P, X	WO, 01/34838, A1 (榮研化学株式会社) 17.5月. 2001(17.05.01) (ファミリーなし)	1-18
A	WO, 97/00330, A2 (HIMMLER, G.) 3.1月. 1997(03.01.97) & AT, 9501007, A & AU, 9658872, A & ZA, 9605019, A & EP, 833942, A2 & JP, 11-509406, W & US, 6033881, A & DE, 59605824, G	1-18

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (Usr. u,**